

Zur Biosynthese der Terpene:
Die Biosynthese
von Geranylgeranyl-pyrophosphat und die
Hemmung der Squalensynthese
durch fluoriierte Mevalonsäuren

von
KASPER KIRSCHNER

1961

Zur Biosynthese der Terpene:
Die Biosynthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat und
die Hemmung der Squalensynthese durch fluorierte
Mevalonsäuren

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Kasper Kirschner
aus
München
Januar 1961



Berichterstatter: Prof. Dr. F. L y n e n

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai, 1961

Der Studienstiftung
des
Deutschen Volkes
in Dankbarkeit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom
September 1958 bis zum November 1960 am Max Planck-
Institut für Zellchemie in München ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.F. L Y N E N ,
danke ich für stetige Anregung und für seine
Erziehung zum kritischen Denken.

Der Hundhammer-Stiftung, der Studienstiftung des
Deutschen Volkes und der Max-Planck-Gesellschaft
danke ich für die Gewährung von Stipendien im
Laufe meines Studiums.

Frau E.M.Liepe danke ich für wertvolle technische
Hilfe bei einem Teil dieser Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Ergebnisse	8
I. Die Biosynthese von Geranylgeranyl- pyrophosphat	8
1. Die Reinigung der Geranylgeranyl- pyrophosphat-Synthetase	8
a) Die Synthese von Farnesyl-pyro- phosphat	9
b) Die biologische Aktivität von synthetischem Farnesyl-pyro- phosphat	11
c) Der Enzymtest	14
d) Reinigungsverfahren	16
2. Eigenschaften der Geranylgeranyl- pyrophosphat-Synthetase	17
a) Komponentenstudien	17
b) Identität von Geranylgeranyl- und Farnesyl-pyrophosphat- Synthetase	26
3. Die Identifizierung des Reaktions- produkts	30
a) Nachweis des Geranylgeranyl-Rests	30
b) Nachweis des Pyrophosphat-Rests	37
4. Der Reaktionsmechanismus	40
II. Die Hemmung der Squalensynthese durch 2- und 3'-Fluormevalonsäure	42
1. Die Biosynthese von 5-Pyrophospha- 2-Fluormevalonsäure	42

a) Die enzymatische Phosphorylierung der 2-Fluormevalonsäure	42
b) Die enzymatische Phosphorylierung der 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure	53
c) Die Hemmung der Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase durch 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonat	58
2. Die Biosynthese von 5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure	64
a) Die Stöchiometrie	64
b) Die Identifizierung von 5-Phospho- und 5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure	67
C. Beschreibung der Versuche	70
I. Reinigung und Eigenschaften der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase	70
1. Die Synthese von Farnesyl-pyrophosphat	70
2. Substrate, Vergleichssubstanzen und Hilfsenzyme	81
3. Die Anreicherung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase	87
a) Der Enzymtest	87
b) Reinigungsverfahren	88
c) Enzymabhängigkeit	89
4. Substratstudien	89
a) Die biologische Aktivität von synth. Farnesyl-pyrophosphat in der Squalensynthese	89
b) Bestimmung von Farnesyl-pyrophosphat mit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase	91
c) Unwirksamkeit von Farnesyl-phosphat	92
d) Farnesyl-pyrophosphat-Abhängigkeit	92
e) Isopentenyl-pyrophosphat-Abhängigkeit	94

	Seite
5. Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	95
a) Hemmung der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase durch Jodacetamid	95
b) Bedarf an Magnesium-Ionen	96
c) pH-Optimum	96
6. Bestimmung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase	97
a) Der Enzymtest	97
b) pH-Optimum	97
II. Die Identifizierung des Geranylgeranyl-pyrophosphats	98
1. Präparative Darstellung von 1- ¹⁴ C-Geranylgeraniol	98
2. Darstellung von Geranylgeranyl-4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-4-ester	99
3. Darstellung von Geranylgeranyl- ³² P-pyrophosphat	101
4. Identifizierung des Pyrophosphatrests	102
III. Versuche mit 2-Fluormevalonsäure	103
1. Allgemeine Analysenmethoden	103
2. Substrate und Enzyme	105
3. Versuche mit 2-Fluormevalonsäure	106
a) Hemmung der Squalensynthese aus 2- ¹⁴ C-Mevaldinsäure	106
b) Hemmung der Mevalonatkinase	106
c) 2-Fluormevalonsäure im optischen Test für die Mevalonatkinase	107
d) Darstellung und Eigenschaften der ³² P-5-Phospho-2-Fluormevalonsäure	108

4. Versuche mit 5-Phospho-2-Fluor- mevalonsäure	110
a) Hemmung der Phosphomevalonatkinase	110
b) Die Phosphorylierung von 5-Phospho- 2-Fluormevalonsäure: Spektrophoto- metrie	110
c) Darstellung und Eigenschaften der ^{32}P - 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure	112
5. Versuche mit 5-Pyrophospho-2-Fluor- mevalonsäure	113
a) Hemmung der Pyrophosphomevalonat- Dekarboxylase	113
b) Unwirksamkeit von 5-Pyrophospho-2- Fluormevalonsäure als Substrat für die Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase: Spektrophotometrie	113
c) Inkubation von 5-Pyrophospho-2-Fluor- mevalonsäure mit Pyrophospho- mevalonat-Dekarboxylase	114

IV. Versuche mit 3'-Fluormevalonsäure 115

1. Die Umwandlung von 3'-Fluormevalonsäure in den Phosphor- und Pyrophosphorsäure- ester: spektrophotometrische Bestimmung der Stöchiometrie	115
2. Enzymatische Synthese von ^{32}P -markierter 5-Phospho- und 5-Pyrophospho-3'-Fluor- mevalonsäure	116
3. Versuch zur Synthese von ^{32}P -4'-Fluor- isopentenyl-pyrophosphat	117

D. Zusammenfassung 118

Literaturverzeichnis 120

Abkürzungen:

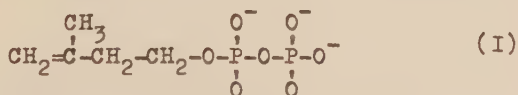
ÄDTA	Äthylendiamin-tetra-acetat
AMP, ADP, ATP	Adenosinmono- bzw. di- bzw. tri-phosphat
CoA, CoASH	Coenzym A
D	Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase
DBÄD	Dibenzyläthylendiamin
DPN, DPNH	Oxydiertes und reduziertes Diphosphopyridinnukleotid
DmalPP	3,3-Dimethylallyl-pyrophosphat
$\Delta E = \log \frac{I_0}{I}$	Extinktion, optische Dichte
$\varepsilon = \frac{\Delta E}{c \cdot l}$ (1/M . cm)	Molarer Extinktionskoeffizient
FaP	Farnesyl-phosphat
FaPP	Farnesyl-pyrophosphat
FMVS	Fluormevalonsäure
GegePP	Geranylgeranyl-pyrophosphat
GePP	Geranyl-pyrophosphat
G1-6-P	Glucose-6-phosphat
HMG	β -Hydroxy- β -methylglutarsäure
IpM	Impulse pro Minute
IspPP	Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphat
JAA	Jodacetamid
K_M	Michaeliskonstante
MDH	Milchsäure-Dehydrogenase
MVK	Mevalonatkinase
MVS	Mevalonsäure
PK	Pyruvatkinase
PFMVS	5-Phospho-Fluormevalonsäure
PMVK	Phosphomevalonatkinase
PMVS	5-Phosphomevalonsäure
PPFMVS	5-Pyrophospho-Fluormevalonsäure
PPMVS	5-Pyrophosphomevalonsäure
$S = M/l$	Konzentration
TPN, TPNH	Oxydiertes und reduziertes Triphosphopyridinnukleotid
TRAM	Tri-äthanolamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
$V = \frac{uM}{St_d}$	Reaktionsgeschwindigkeit

Geheimnisvoll am lichten Tag
Läßt sich Natur des Schleiers nicht berauben,
Und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,
Das zwingst du ihr nicht ab mit Hebeln und mit Schrauben.

(Goethe, "Faust" I)

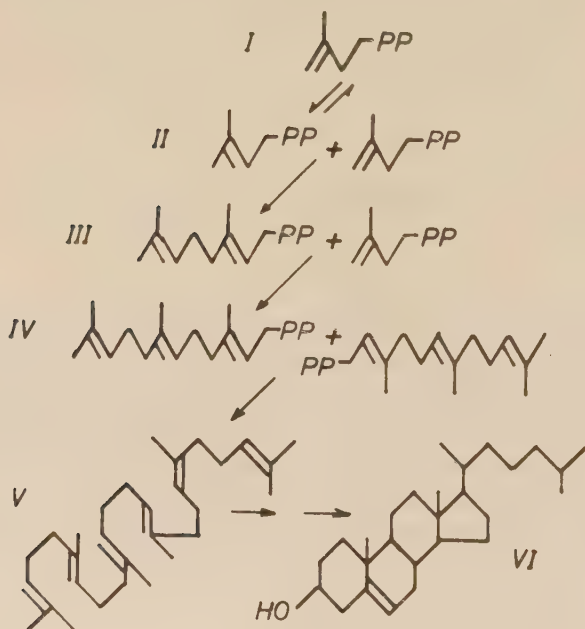
A. Einleitung

Die Untersuchungen über die Biosynthese der Terpene aus Essigsäure¹⁾ führten einerseits zu der Entdeckung des universalen Terpenbausteins und stellten andererseits den biologischen Bauplan klar, nach dem die Terpene durch Aneinanderfügen von C₅-Einheiten synthetisiert werden: Mit dem Δ³-Isopentenyl-pyrophosphat (I) wurde das von der Ruzicka'schen "Isoprenregel" geforderte "aktive Isopren" gefunden^{2,3)}.



In der Isomerisierung des Δ³-Isopentenyl-pyrophosphats zum 3,3-Dimethylallyl-pyrophosphat (II)⁴⁾ und dessen Kettenverlängerung über das Geranyl-pyrophosphat (III)⁵⁾ zum Farnesyl-pyrophosphat (IV)³⁾ wurde das Prinzip entdeckt, nach dem die reguläre "Kopf-zu-Schwanz" Kondensation der Isopreneinheiten zu den kettenförmigen Terpenen erfolgt. Die reduktive Dimerisierung des Farnesyl-pyrophosphats zum Squalen (IV)³⁾ stellt schließlich den biologischen Typus der irregulären "Schwanz-zu-Schwanz" Kondensation dar. Die anschließende Cyklisierung des Squalens (V) zum Lanosterin und dessen Umlagerung zum Cholesterin (VI)^{6,7)} stehen am Ende

der vielgliedrigen Biosynthesekette, die vom Acetyl-CoA zu den komplizierten Ringstrukturen der Sterine führt.



Schema 1: Die Biosynthese des Cholesterins aus Isopentenyl-pyrophosphat

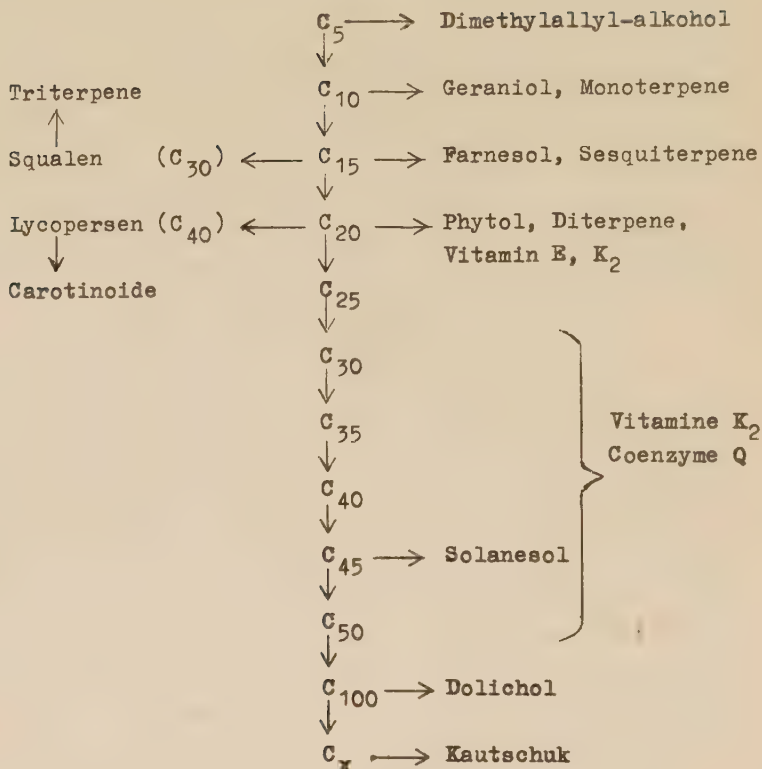
Der bei der Biosynthese der Triterpene entdeckte Bauplan ist das biochemische Prinzip, das der von Ruzicka formulierten und bei der Strukturaufklärung der Terpene so fruchtbaren "biogenetischen Isoprenregel" zugrunde liegt⁸⁾: Diese definiert die Terpene als "eine Klasse von Verbindungen, deren Struktur und stereochemischer Feinbau aus aliphatischen Vorstufen vom Typus des Geraniols, Farnesols, Geranylgeraniols und Squalens nach bekannten Cyclisierungs- und Umlagerungsmechanismen der organischen Chemie abgeleitet werden kann."

Die Untersuchungen über die Biosynthese der cyclischen Mono- und Diterpene^{9,10,11)}, der Carotinoide^{12,13)}, der Vitamine K₁^{14,15)}, der Coenzyme Q^{14,16)} und des Kautschuks^{1,17)} machen es sehr wahrscheinlich, daß auch hier die kettenförmigen Terpenvorstufen durch den beim Farnesyl-pyrophosphat entdeckten Mechanismus der Kettenverlängerung aus Isopentenyl-pyrophosphat aufgebaut werden. Dabei wird die ganze Kette der homologen Polyterpenyl-pyrophosphate bis zum hochpolymeren Kautschuk durchlaufen. Die für die Biosynthese der verschiedensten Terpene und Terpenderivate benötigten Polyterpenyl-pyrophosphate können jeweils aus dieser Biosynthesekette abgezweigt werden (siehe Schema 2 S.4).

So können auf der Stufe des Geranyl-pyrophosphats durch Cyclisierung das Pinen⁹⁾ und der Campher, auf der Stufe des Farnesyl-pyrophosphats die cyclischen Sesquiterpene wie z.B. Bisabolen, auf der Stufe des Geranylgeranyl-pyrophosphats durch sekundäre Umwandlungen das Phytol und Geranyllinalool¹⁸⁾ Vitamin E, Vitamin K₂, Coenzym Q₄, cyclische Diterpene wie die Gibberellinsäure^{2,11)} und Rosenonolaktone¹⁰⁾ und schließlich, durch Dimerisierung, die Carotinoide^{12,13)} entstehen. Für die isoprenologen Reihen der Vitamine K₂ und Coenzyme Q^{14,15,16)} stehen höhere Polyterpenyl-pyrophosphate zur Verfügung. Auch die Bildung von Solanesol (C₄₅)^{19,20,21)} und Dolichol (C₁₀₀)²²⁾ verläuft sehr wahrscheinlich über die entsprechenden Pyrophosphorsäure-ester.

Obwohl die Biosynthese der höheren Polyterpenyl-pyrophosphate über das Farnesyl-pyrophosphat hinaus noch nicht systematisch untersucht worden ist, gibt es bereits Anhaltspunkte für die Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat. So konnte Henning in rohen Hefe-Extrakten die Bildung von Geranyllinalool aus Isopentenyl-pyrophosphat beobachten²³⁾, und Popják fand bei der Inkubation von Mevalonsäure mit Proteinfractionen aus Rattenleber unter den Produkten der Säurehydrolyse zwei gaschromatographisch isolierte Terpenalkohole, die er als Geranylgeraniol und Geranyllinalool ansprach²⁴⁾.

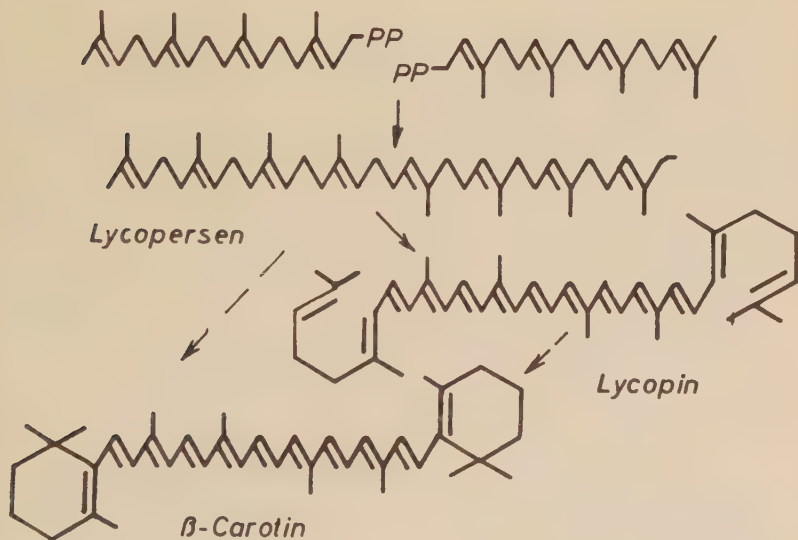
Terpenyl-
pyrophosphate



Schema 2: Allgemeiner Bauplan zur Biosynthese
der Terpene

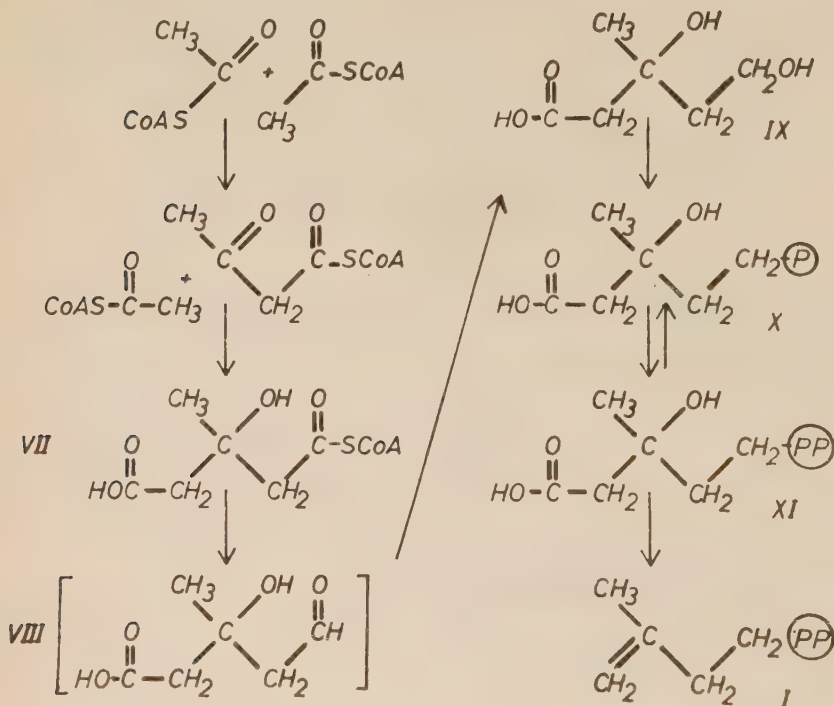
Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun, die biochemische Kettenverlängerung des Farnesyl-pyrophosphats zu den höheren Terpenyl-pyrophosphaten zu untersuchen. Dabei beansprucht die Synthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat besonderes Interesse, weil es die unmittelbare, aliphatische Vorstufe für eine Reihe wichtiger Naturstoffe, insbesondere

für die Carotinoide darstellt: Durch reduktive Dimerisierung zweier Molekel Geranylgeranyl-pyrophosphat(C_{20}) könnte, in Analogie zu der "Schwanz-zu Schwanz" Kondensation des Farnesyl-pyrophosphats zum Squalen (vgl. Schema 1), als erster Vertreter der aliphatischen Tetraterpene das Lycopersen²⁵⁾ (C_{40}) entstehen, welches durch stufenweise Dehydrierung bzw. Cyklisierung in Lycopin bzw. β -Carotin übergehen kann:



Schema 3: Hypothetisches Schema zur Biosynthese der Carotinoide aus Geranylgeranyl-pyrophosphat

Die Biosynthese der verschiedensten Terpene aus Acetyl-CoA beschreitet bis zur Stufe des Δ^3 -Isopentenylpyrophosphats (I) ein und denselben Weg, der im Folgenden schematisch skizziert ist:



Schema 4: Biosynthese des Isopentenyl-pyrophosphats aus Acetyl-CoA.

Der damit gegebene, gemeinsame Stammbaum stellt aber auch einen Engpaß dar, an dem die Biosynthese der Terpene aus Acetat generell beeinflusst werden kann. Der enge Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und dem Cholesterin-

haushalt läßt eine Beeinflußung der Cholesterinsynthese auch von klinischer Seite besonders interessant erscheinen.

Die enzymatische Spaltung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (VII) zu Acetyl-CoA und Acetacetat²⁶⁾, die Reduktion von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA über die Stufe der Mevaldinsäure (VIII) zur Mevalonsäure (IX) durch die HMG-Reduktase²⁷⁾ und das reversible Gleichgewicht bei der enzymatischen Phosphorylierung der 5-Phosphomevalonsäure (X) zur 5-Pyrophosphomevalonsäure (XI)^{28,29,30)} sind Ansatzpunkte für eine mögliche biologische Regulation der Terpenbildung.

In diesem Abschnitt der Terpensynthese können auch unphysiologische Substanzen eingreifen, die als spezifische Hemmstoffe die enzymatische Reaktionsfolge an einer bestimmten Stelle blockieren. Da die Mevalonsäure als irreversible Zwischenstufe bei der Biosynthese der Terpene aus Acetat eine zentrale Rolle spielt --- für *lactobacillus acidophilus* stellt sie einen Wuchsstoff dar³¹⁾ --- beansprucht die Frage nach der Wirkung von Mevalonsäure-antimetaboliten großes Interesse.

Bei der Suche nach einem geeigneten Antimetaboliten (eine Problemstellung, die inzwischen von mehreren Arbeitskreisen aufgegriffen worden ist^{32,33,34,35,36)}) bot sich eine Analogie in der Blockierung des Tricarbonsäure-cyklus durch Fluorcitronensäure an³⁷⁾, bei der es zur Anhäufung von Citrat durch Hemmung der Aconitase kommt. Eingedenk der Rolle, die fluoriierte Steroide auf dem pharmazeutischen Gebiet spielen³⁸⁻⁴²⁾ und der seit der Arbeit von Langdon⁴³⁾ bekannten Tatsache, daß Fluoracetat nicht nur in Fluorcitrat, sondern auch in die Fraktion der unverseifbaren Lipide eingebaut wird, untersuchten wir die Wirkung fluorierter Mevalonsäuren auf die Biosynthese des Squalens.

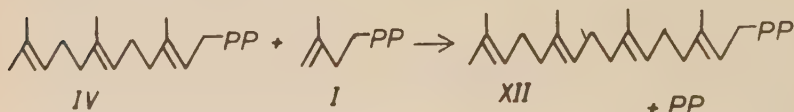
Die Bereitstellung weniger Gramm synthetischer 2-Fluor-mevalonsäure durch Herrn Dr. Schmidt (Fa. K. Thomä, Biberach a. d. Riß) und 10 mg 3'-Fluormevalonsäure durch Herrn Dr. H. Machleidt (Universität Hamburg) ermöglichten die in dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit berichteten Untersuchungen.

B. Ergebnisse

I. Die Biosynthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat

1. Die Reinigung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

Die Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase ist jenes Enzym, welches die Alkylierung von Isopentenyl-pyrophosphat (I) mit Farnesyl-pyrophosphat (IV) unter Bildung des Geranylgeranyl-pyrophosphats (XII) katalysiert:



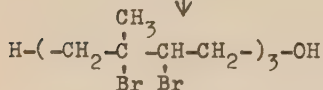
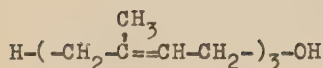
Um diesen Reaktionsschritt aus der vielgliedrigen Synthesekette der höheren Terpene als isolierte Reaktion studieren zu können, wurden größere Mengen von unmarkiertem Farnesyl-pyrophosphat und markiertes Isopentenyl-pyrophosphat benötigt. 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat ist nach Eggerer's Methode⁴⁴⁾ zugänglich; da aber Farnesyl-pyrophosphat bisher nur durch enzymatische Synthese in für diesen Zweck zu kleinen Mengen gewonnen werden konnte, wurde die chemische Synthese der Verbindung in Angriff genommen.

a) Die Synthese von Farnesyl-pyrophosphat

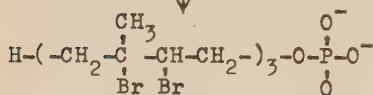
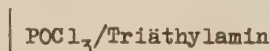
Durch Eggerer's Synthese des 3,3-Dimethylallyl- und des Geranyl-pyrophosphats⁴⁵⁾ war der Weg für die Synthese des höheren Isoprenologen bereits vorgezeichnet. (Die elegante Synthese des Geranyl- und des Farnesyl-pyrophosphats, über die Cramer und Böhm kürzlich berichteten⁴⁶⁾, war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht bekannt). Ganz analog wurde in diesem Fall nach Eggerer's Prinzip vorgegangen: Durch Bromaddition an die Doppelbindung des Farnesols wurde die Allylgruppierung vorübergehend maskiert, so daß auch Reaktionen und Aufarbeitungsgänge in saurem Milieu durchgeführt werden konnten.

Als Ausgangsmaterial diente ein aus ätherischen Ölen gewonnenes, handelsübliches Farnesol, von dem mit Sicherheit anzunehmen war, daß es sich um das reine all-trans-Isomere handelte⁴⁷⁾. Synthetisches Farnesol besteht dagegen aus einem Gemisch der verschiedenen cis-trans-Isomeren⁴⁸⁾ und würde zu einem ebenso zusammengesetzten Pyrophosphorsäure-ester führen. Da die bisher bekannten, aliphatischen Terpene wie z.B. Squalen⁴⁹⁾ all-trans-Konfiguration besitzen, wäre ein solches Präparat von Anfang an mit dem Odium beschränkter biologischer Aktivität, wenn nicht gar Hemmwirkung behaftet (vgl.⁵⁰⁾).

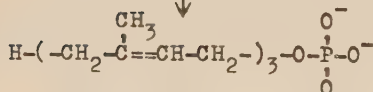
Die Umsetzung von Farnesol mit der stöchiometrischen Menge Brom in Chloroform führte zu dem bisher unbekannten 3,7,11-Trimethyl-2,3,6,7,10,11-hexabrom-dodecanol (vgl.⁵¹⁾), das als gelbliches, zähes Harz in fast quantitativer Ausbeute gewonnen wurde. Wegen der Empfindlichkeit der Verbindung gegenüber Licht und Feuchtigkeit wurde kein Versuch unternommen, das Reaktionsprodukt zu kristallisieren. Das rohe Hexabromfarnesol wurde mit POCl_3 in Triäthylamin/Chloroform zur Hexabromfarnesyl-phosphorsäure umgesetzt, die als Dicyclohexylammonium-salz (Schmp. 97-99°) kristallisiert werden konnte. Die reduktive Entbromierung der Verbindung mit 2 proz. Natrium-Amalgam in Methanol führte quantitativ zum Farnesyl-phosphat, das in 75 proz. Ausbeute als kristallisiertes Natrium-Cyklohexylammoniumsalz (Schmp. 134-139°)



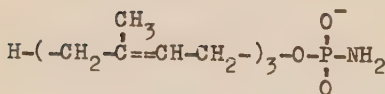
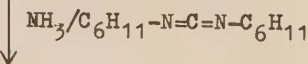
(95%) nicht isoliert



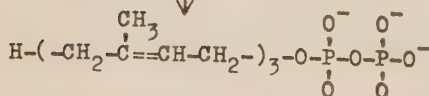
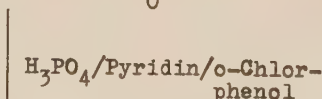
(52%) Di-Cyklohexyl-
ammoniumsalz
Schmp. 97-99°



(75%) Na-Cyklohexyl-
ammoniumsalz
Schmp. 134-139°



(100%) nicht isoliert



(20%) Triammoniumsalz
Schmp. 107-114°

Schema 5: Synthese des Farnesyl-pyrophosphats

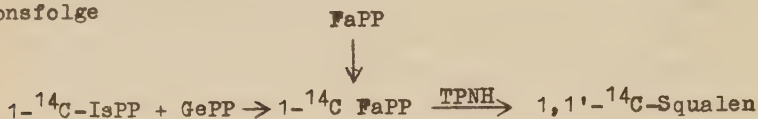
anfiel. Nach Überführung in das Ammoniumsalz wurde die Verbindung mit Ammoniak und Cyklohexyl-carbodiimid in tert. Butanol zum Farnesyl-phosphorsäure-amid umgesetzt. Die papierchromatographische Analyse des als rohes N,N'-Dicyklohexy-guandiniumsalz vorliegenden Reaktionsproduktes in n-Propanol/konz. NH_3 /Wasser (8:1:1) zeigte eine vollständige Umwandlung von Farnesyl-phosphat ($R_F = 0,53$) in Farnesyl-phosphorsäureamid ($R_F = 0,80$) an. Bei der Behandlung des rohen Phosphorsäure-esteramidats mit Phosphorsäure in Pyridin/o-Chlorphenol bildete sich schließlich Farnesyl-pyrophosphat ($R_F = 0,35$) neben Farnesyl-phosphat und anorg. Phosphat ($R_F = 0,00$). Durch Extraktion mit Collidin und Verteilung zwischen Collidin/Wasser wurde die Hauptmenge des anorg. Phosphats entfernt. Die Trennung von Farnesyl-phosphat und Farnesyl-pyrophosphat erfolgte anschließend durch präparative Papierchromatographie. Aus dem Eluat der Farnesyl-pyrophosphat-zone konnte zuletzt das Tri-ammonium-salz der Farnesyl-pyrophosphorsäure in Form von rechteckigen Blättchen aus Methanol/Aceton/Wasser kristallisiert werden (Schmp. $107-114^\circ$). Die Ausbeute, bezogen auf Farnesol, betrug 7% d.Th.

Wenn auch die chemische Analyse eindeutig für das Vorliegen von Farnesyl-pyrophosphat sprach, stand noch die Frage nach der geometrischen Konfiguration der Doppelbindungen und damit der biologischen Aktivität der synthetischen Verbindung offen. Da wenig Aussicht bestand, das Problem auf physikalischem Wege zu lösen --- cis-trans-Isomerie ist bei farblosen Terpenen weder im IR- noch im UV-Spektrum eindeutig festzustellen^{52,53}) --- wurde als empfindlichstes stereospezifisches Reagens das partikuläre Enzym verwendet, das die reduktive Dimerisierung des Farnesyl-pyrophosphats zum Squalen katalysiert.

b) Die biologische Aktivität von synthetischem Farnesyl-pyrophosphat

Die biologische Aktivität von synthetischem Farnesyl-pyrophosphat wurde mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode

nachgewiesen. In der skizzierten, biosynthetischen Reaktionsfolge



erscheint ${}^1\text{-}^{14}\text{C}$ -Farnesyl-pyrophosphat als Zwischenstufe (vgl. Schema 1). Setzt man dem Reaktionsgemisch von Anfang an unmarkiertes Farnesyl-pyrophosphat zu, so wird das intermediär gebildete, radioaktive Farnesyl-pyrophosphat verdünnt. Dies hat unter geeigneten Bedingungen zur Folge, daß die spezifische Aktivität des Squalens abnimmt, während gleichzeitig die Aktivität in der Fraktion des Farnesyl-pyrophosphats um eben diesen Betrag ansteigt. Unter "geeigneten Bedingungen" ist hier gemeint, daß die Dimerisierung des Farnesyl-pyrophosphats langsamer abläuft als dessen Bereitstellung aus ${}^1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat. Dadurch wird die zu messende Reaktion geschwindigkeitsbestimmend. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb. 1 (siehe S. 13) wiedergegeben.

Wie man sieht, nimmt die Radioaktivität in der Squalenfraktion bei Zugabe steigender Mengen von synth. Farnesyl-pyrophosphat tatsächlich fortschreitend ab, wogegen die Aktivität in der Fraktion des Farnesyl-pyrophosphats zunimmt. Die Summe der Aktivitäten beider Fraktionen bleibt dabei konstant, was beweist, daß die Bildungsgeschwindigkeit des markierten Farnesyl-pyrophosphats von der Zugabe des synthetischen Materials nicht beeinflußt wird. Aus den bekannten Mengen des zugesetzten Farnesyl-pyrophosphats läßt sich die Verdünnung der Radioaktivität im Squalen und die Anhäufung der Radioaktivität im Farnesyl-pyrophosphat berechnen (ausgezogene Kurven): Obwohl die Übereinstimmung der Meßwerte mit den berechneten Kurven gut ist, erlaubt diese indirekte Methode der Aktivitätsbestimmung nur eine halbquantitative Aussage.

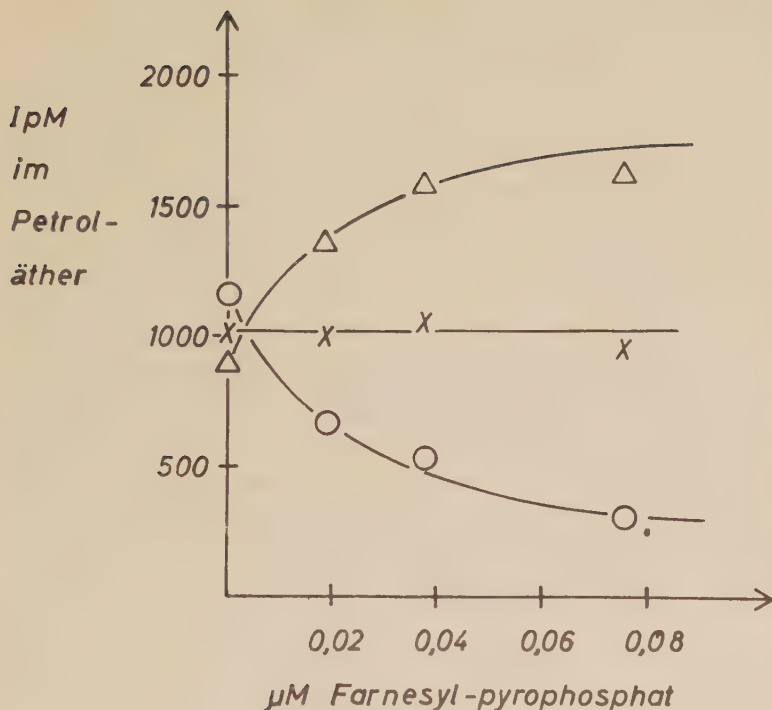


Abb. 1: Isotopenverdünnungseffekt mit synthetischem Farnesyl-pyrophosphat bei der Squalensynthese

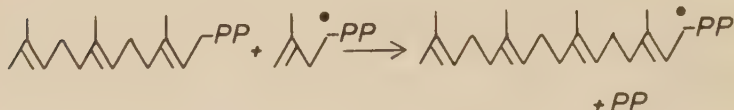
Ansätze: 20 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 6 μM MgCl_2 , 6 μM $\text{K}_2\text{-Mg-ÄDTA}$, 3 μM JAA, 0,4 μM TPN, 2 μM Na-Gl-6-P , 1 mg Serumalbumin, 10 μg Zwischenferment, 0,95 mg Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase, 0,02 ml Hefepartikel-suspension, wurden in einem Vol. von 0,5 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,4 μM $(\text{NH}_4)_2\text{-Geranyl-PP}$, 0,06 μM $\text{K}_2\text{-1-}^{14}\text{C-Isoentenyl-PP}$ und Farnesyl-PP wie in der Abb. 10 min. bei 37° inkubiert. Vol. = 0,6 ml. Squalen wurde direkt, Farnesol nach dem Ansäuern extrahiert.
 O = Squalen, X = Farnesol, X = 1/2 (Squalen + Farnesol) — = ber. Kurven.

Mit dem in der Squalensynthese aktiven Farnesyl-pyrophosphat konnte nun die enzymatische Alkylierung des Iso-

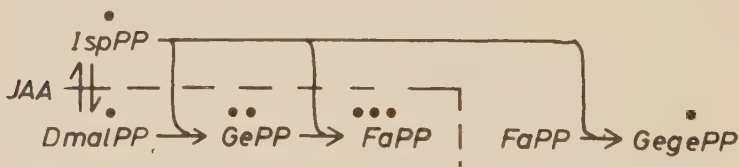
pentenyl-pyrophosphats zum Geranylgeranyl-pyrophosphat untersucht werden.

c) Der Enzymtest

Um die Kinetik der zu untersuchenden Reaktion verfolgen



zu können, wurde, in Analogie zu dem für die Synthese des Farnesyl-pyrophosphats verwendeten Test⁵⁾, ein auf der Säurelabilität des Reaktionsproduktes aufbauendes Verfahren entwickelt. Um die Verlängerung des Farnesyl-pyrophosphats um eine Isopreneinheit als isolierte Reaktion studieren zu können, mußten die vorgelagerten Reaktionen durch Zusatz von Jodacetamid ausgeschaltet werden⁵⁾.



Durch die Hemmung der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase wird die Bildung von Dimethylallyl-pyrophosphat unterbunden⁴⁾, das Substrat, das die anschließende Kettenverlängerung zum Farnesyl-pyrophosphat unter Katalyse der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase einleitet. Auf diese Weise wird die ganze Enzymkette blockiert, die zur Synthese von dreifach markiertem Farnesyl-pyrophosphat aus 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat führen würde. Durch Einsatz von synthetischem, unmarkiertem Farnesyl-pyrophosphat, dem Produkt der gehemmten Reaktionsfolge, läßt sich die Biosynthese des nächsthöheren Terpenyl-pyrophosphats als einzelner Reaktionsschritt studieren

Nach Bebrüten von markiertem Isopentenyl-pyrophosphat, Farnesyl-pyrophosphat und Magnesium-ionen mit dem mit Jodacetamid vorbehandeltem Enzym ist das gebildete 1-¹⁴C-

Geranyl-geranyl-pyrophosphat die einzige radioaktive, säurelabile Verbindung (Isopentenyl-pyrophosphat liefert bei der Säurespaltung kein petrolätherlösliches Bruchstück⁴⁴), und Farnesyl-pyrophosphat ist nicht markiert). Die Analyse des in einer bestimmten Zeit gebildeten Reaktionsproduktes erfolgt deshalb auf rasche und bequeme Weise: Der Ansatz wird mit Trägern versetzt und angesäuert. Dabei wird Geranyl-geranyl-pyrophosphat rasch zu anorg. Pyrophosphat und einem Gemisch von markierten Terpenalkoholen gespalten, die anschließend mit Petroläther extrahiert und im Scintillationszähler ausgezählt werden können. Aus der bekannten spezifischen Radioaktivität des eingesetzten 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphats läßt sich auch der molare Umsatz berechnen.

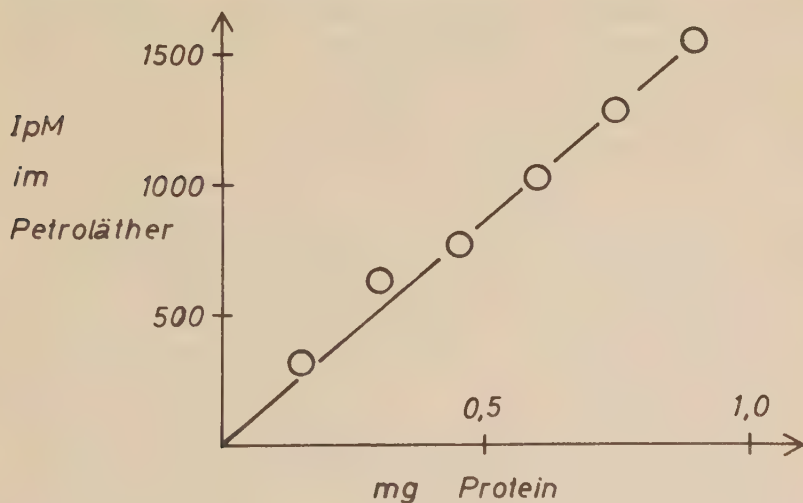


Abb. 2: Enzymabhängigkeit der Synthese von Geranyl-geranyl-pyrophosphat

System: 40 μ M K-PO₄-puffer pH 6,0; 4 μ M MgCl₂; 6 μ M K₂-Mg-ÄDTA; 12 μ M Jodacetamid; 1 mg Serumalbumin und Enzym (Ammonsulfatfraktion 0,6-0,7 Sättigung). Vol. = 0,6 ml; 15 Min. bei 37° präinkubiert. Start mit 0,15 μ M (NH₄)₂Farnesyl-pyrophosphat, 0,06 μ M K₂-1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM); Inkubation: 30Min. bei 37°. Nach Ansäuern mit Petroläther extrahiert, mit 0,5 n KOH gewaschen und gezählt

Als eine Enzym-Einheit wird im Folgenden diejenige Menge Enzym definiert, die unter den oben beschriebenen Testbedingungen in 1 Min. 1 μM Geranylgeranyl-pyrophosphat synthetisiert.

d) Reinigungsverfahren

Mit dem Enzymtest konnte die Anreicherung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase in Angriff genommen werden. Die von Henning beobachtete Bildung von radioaktivem Geranyl-linalool aus markiertem Isopentenyl-pyrophosphat²³⁾ in rohen Proteinfractionen aus Bäckerhefe und das Vorkommen von Coenzym Q_6 , das eine isoprenoide Seitenkette mit 6 Isopren-Einheiten enthält, in demselben Organismus⁵⁴⁾, ließen die Wahl auf Bäckerhefe als Ausgangsmaterial für die Enzymanreicherung fallen.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Autolyse mit Toluol. Nach zweistündiger Autolyse wurde abzentrifugiert und der Überstand ausgiebig dialysiert. Die anschließende Säurefällung verläuft mit minimalen Verlusten an Enzym, und dient zur Entfernung eines Teils der Nukleinsäuren. Bei der darauffolgenden Zugabe von $\text{Al}(\text{OH}_3)\text{-Cl}$ -gel blieb die Aktivität im Überstand. Durch Ammonsulfatfällung (60-70% Sättigung) konnte schließlich eine insgesamt 5-6fache Anreicherung erzielt werden.

Weitere Versuche zur Reinigung des Enzyms mit den konventionellen Methoden, wie z.B. Fraktionierung mit Aceton oder selektive Hitzedenaturierung, waren erfolglos. Wahrscheinlich würden die modernen Methoden der Proteinchromatographie eher zum Ziele führen. Die dialysierte Ammonsulfatfraktion war jedoch genügend aktiv, um die im Folgenden beschriebenen Versuche auszuführen. Das Schema für einen typischen Anreicherungsangang ist in folgender Tabelle (siehe S.17) wiedergegeben:

Tabelle 1

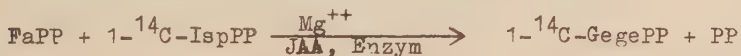
Schema der Anreicherung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

Fraktion	Protein (mg)	E.E.	spez. Akt. · 10 ⁻³ E.E./mg	Ausbeute %
Toluolautolysat aus 1 kg Hefe, dialysiert.	5810	1,04	0,18	= 100
Filtrat der Säurefällung	3920	0,98	0,25	95
Al(OH) ₃ -Gel- überstand	1570	0,72	0,46	70
Ammonsulfat- fraktion (60-70% S.)	580	0,55	0,95	53

2. Eigenschaften der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

a) Komponentenstudien

Mit dem gereinigten Enzym wurden zuerst die optimalen Reaktionsbedingungen untersucht. Dazu wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den verschiedenen Komponenten der enzymatischen Reaktion studiert, die in folgender Gleichung zusammengefaßt sind:



Die nach Agranoff⁴⁾ für die Hemmung der Isomerase notwendige Jodacetamid-Konzentration reicht bei den im Folgenden eingesetzten Proteinmengen nicht aus. Besonders in den ersten Fraktionen der Anreicherung, die noch viel Isomerase enthalten, ist eine Erhöhung der Jodacetamid-Konzentration erforderlich. Glücklicherweise wird die Synthetase auch bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ m Jodacetamid nicht gehemmt. Abb.3 (siehe S.18) gibt die Abhängigkeit der Kinetik von der Jodacetamid-Konzentration wieder, wie sie unter den beschriebenen Testbedingungen (vgl. S.15) im dialysierten Toluolautolysat gemessen wurde.

Der hohe Blindwert ($\Delta-\Delta$) bei niederen Konzentrationen an Jodacetamid ist auf die noch immer stattfindende Synthese von markiertem Farnesyl-pyrophosphat zurückzuführen: Bei der Papierchromatographie der radioaktiven Terpenalkohole, die nach dem Ansäuern solcher Ansätze gewonnen wurden, war der C_{15} -Alkohol das Hauptprodukt. Bei Erhöhung der Jodacetamid-Konzentration wird die störende Bildung von radioaktiven Farnesyl-pyrophosphat auf ein vernachlässigbares Minimum herabgedrückt. Die Differenz zwischen dem Gesamtwert (O---O) und dem Blindwert, die der gebildeten Menge Geranylgeranyl-pyrophosphat entspricht, erreicht dabei ein Plateau (X---X).

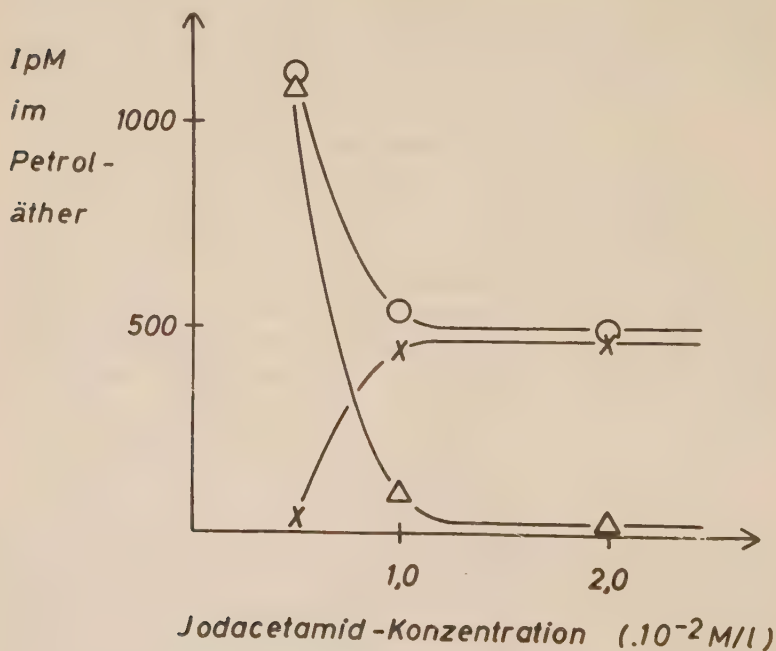


Abb. 3: Hemmung der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase durch Jodacetamid

Ansatz und Aufarbeitung wie in Abb. 2.

0,97 mg dialysiertes Toluolautolysat

Δ --- Δ = ohne Zusatz von Farnesyl-pyrophosphat

O---O = mit Zusatz von Farnesyl-pyrophosphat

X---X = Differenz von O---O und Δ --- Δ

Das angereicherte Enzym (Ammonsulfatfraktion 0,6-0,7 Sättigung) ist soweit frei von Isomerase, daß eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ m Jodacetamid zur vollständigen Hemmung der Isomerase ausreicht.

In Gegenwart von Jodacetamid ist die enzymatische Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat streng von dem Zusatz von Farnesyl-pyrophosphat abhängig. In Analogie zur Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase⁵⁾ kann das Enzym nur den Pyrophosphorsäure-ester des Farnesols verwerten. Folgende Tabelle zeigt, daß Farnesyl-phosphat an Stelle des -pyrophosphats zu keinem säurelabilen, radioaktiven Reaktionsprodukt führt. In Gegenwart des Phosphat-esters wird die Reaktion mit Farnesyl-pyrophosphat sogar beträchtlich gehemmt:

Tabelle 2
Unwirksamkeit von Farnesyl-phosphat für die
Synthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat

	Zusätze	IpM im Petroläther
1.	---	27
2.	0,2 uM Farnesyl-PP	2519
3.	0,2 uM Farnesyl-P	27
4.	0,2 uM Farnesyl-PP + 0,2 uM Farnesyl-P	1307

Ansätze, Inkubation und Aufarbeitung wie in
Abb.2

Mit der gereinigten Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Farnesyl-pyrophosphat entwickelt. Da das Enzympräparat noch anorg. Pyrophosphatase enthält, wird anorg. Pyrophosphat, das bei der Alkylierung des Isopentenyl-pyrophosphats mit Farnesyl-pyrophosphat freigesetzt wird, rasch zu Orthophosphat gespalten und auf diese Weise die Reaktion ganz auf die Seite der Synthese verschoben: Farnesyl-pyrophosphat wird durch Inkubation mit überschüssigem, radioaktiven

Isopentenyl-pyrophosphat und Enzym quantitativ in markiertes Geranylgeranyl-pyrophosphat überführt, welches nach der Säurespaltung mit Petroläther extrahiert und quantitativ bestimmt werden kann. Folgende Abbildung gibt einen Versuch wieder, in dem verschiedene Mengen Farnesyl-pyrophosphat eingesetzt wurden:

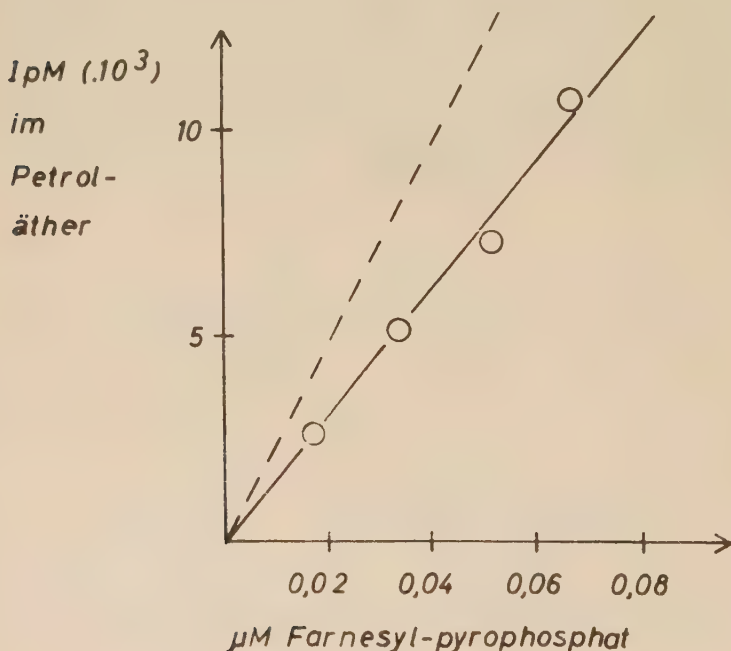


Abb.4: Enzymatische Bestimmung von synth.Farnesyl-pyrophosphat mit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

Ansätze: 80 µM K-PO₄-puffer pH 6,0, 8 µM MgCl₂, 12 µM K₂-Mg-ADTA, 12 µM Jodacetamid, 2 mg²Serumalbumin, 3 mg Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂), werden in einem Vol. von 1 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Nach Zusatz von je 0,12 µM K₂-1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat (2,38.10⁵ IpM/µM) und (NH₄)₃-Farnesyl-pyrophosphat wie in der Abb. wurde in einem Vol. von 1,2 ml 4 Std. bei 37° inkubiert. Aufarbeitung und Zählung wie in Abb.2. (O---O) = synth.Farnesyl-pyrophosphat (---) = theoret.Kurve für 100 proz.Aktivität

Wie man sieht, ist die Radioaktivität im Geranylgeranyl-pyrophosphat den Zusätzen von Farnesyl-pyrophosphat direkt proportional. Die Meßkurve liegt jedoch tiefer als die für 100 proz. Aktivität des Präparates berechnete Gerade. Die Auswertung des Versuchs zeigt, daß das eingesetzte, synthetische Farnesyl-pyrophosphat nur zu 65% umgewandelt wird. Vermutlich handelt es sich bei dem biologisch inaktiven Anteil von 35% um die unnatürlichen cis-Isomeren des Farnesyl-pyrophosphats, die im Zuge der Bromierung und Entbromierung während der Synthese entstanden sein können.

Mit Hilfe des Enzymtests wurde auch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Farnesyl-pyrophosphats studiert. In folgender Abb. ist die Substratabhängigkeit des Enzyms bei pH 6,0 wiedergegeben:

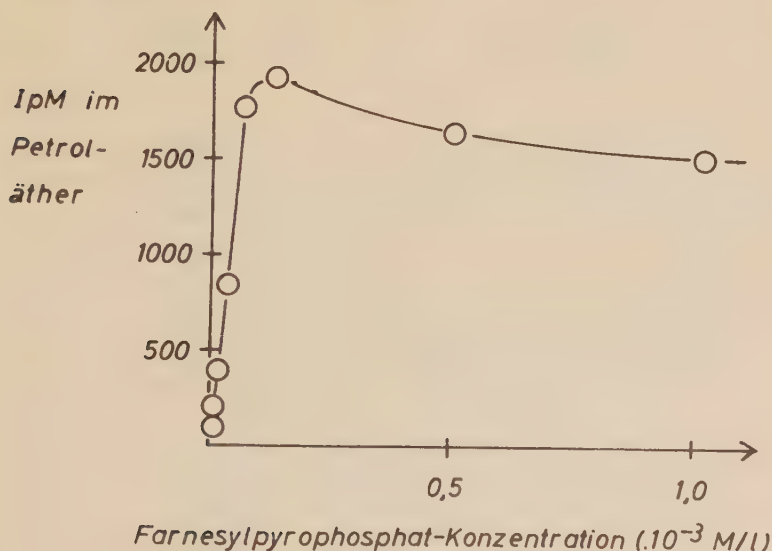


Abb.5: Substratabhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase für Farnesyl-pyrophosphat
Ansätze wie in Abb.2. Die verschiedenen Zusätze von $(\text{NH}_4)_3\text{-Farnesyl-pyrophosphat}$ sind der Abb. zu entnehmen. Inkubation und Aufarbeitung wie in Abb.2 beschrieben. Bei der Angabe der Farnesyl-pyrophosphat-Konzentration ist nur der biologische Anteil von 65% berücksichtigt worden

Aus dem ansteigenden Ast der Kurve läßt sich nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁵⁾ die Michaeliskonstante des Enzyms für Farnesyl-pyrophosphat bei pH 6,0 berechnen:

$$K_M_{\text{pH } 6,0} = 4 \cdot 10^{-3} \quad (\text{M/l})$$

Der anormale Abfall bei höheren Konzentrationen des Substrats ist auf die Fällung von unlöslichem Mg-Farnesyl-pyrophosphat zurückzuführen, was man an der Trübung der sonst klaren Ansätze beobachten kann.

Um einen Vergleich mit der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase zu ermöglichen, wurde die Bestimmung der Michaeliskonstante bei pH 8,0 wiederholt:

$$K_M_{\text{pH } 8,0} = 0,8 \cdot 10^{-4} \quad (\text{M/l})$$

Die Substratabhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase für das zweite Substrat, Isopentenyl-pyrophosphat, verläuft ebenfalls anormal. Bei höheren Konzentrationen wirkt das Substrat in zunehmendem Maße selbsthemmend auf die Reaktion (Abb.6 siehe S.23).

Aus den Werten des aufsteigenden Astes der Kurve läßt sich die Michaeliskonstante des Enzyms für Isopentenyl-pyrophosphat bei pH 8,0 graphisch ermitteln:

$$K_M_{\text{pH } 8,0} = 6 \cdot 10^{-5} \quad (\text{M/l})$$

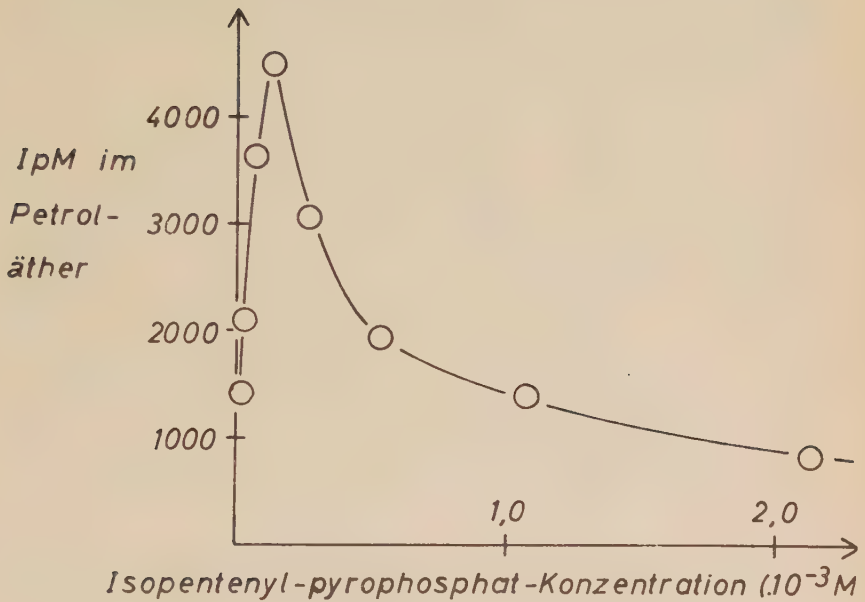


Abb.6: Substratabhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase für Isopentenyl-pyrophosphat.

Ansatz: 20 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0; 6 μM $MgCl_2$; 6 μM K_2 -Mg-ADTA; 3 μM Jodacetamid; 1 mg Serumalbumin, 0,98 mg Synthetase. Vol. 0,6 ml, 15 Min. bei 37° präinkubiert. Start mit 0,2 μM $(NH_4)_2$ Farnesyl-pyrophosphat und K_2 -1- ^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat (245000 IpM/ μM).

Inkubation und Aufarbeitung wie in Abb.2 beschrieben. Die Meßwerte sind durch Subtraktion der Blindwerte korrigiert

Ähnlich wie bei der Synthese von Farnesyl-pyrophosphat ist die Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat an die Aktivierung durch Magnesiumionen gebunden. Abb.7 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Mg^{++} -Konzentration:

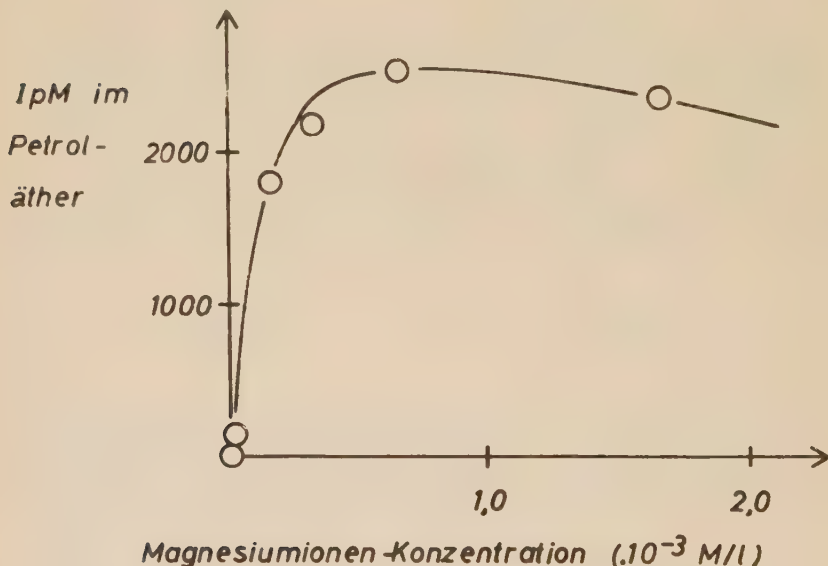


Abb.7: Magnesiumionen-Abhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase
Versuchsbedingungen wie in Abb.2.
 K_2 -Mg-ÄDTA wurde weggelassen

Wie man sieht, findet ohne Magnesiumionen keine Reaktion statt. Das System ist mit $0,6 \cdot 10^{-3} M$ $MgCl_2$ gesättigt.

Die in Abb.8 wiedergegebene pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion zeigt ein scharfes pH-Optimum bei pH 6,0:

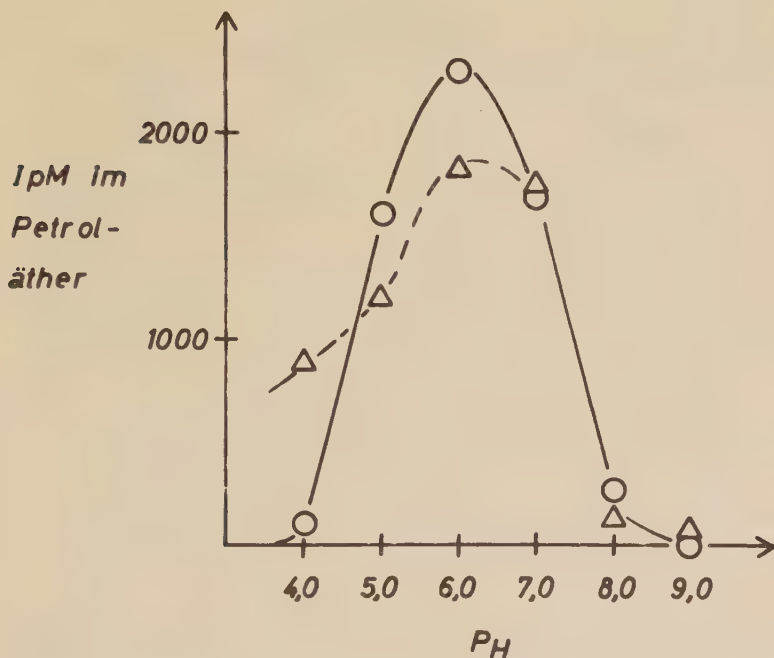


Abb.8: pH-Abhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat- und der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase

Ansätze: je 40 μ M K-Acetat-puffer für pH 4,0 und 5,0; je 40 μ M K- PO_4 -puffer für pH 6,0 und 7,0; je 40 μ M Tris/HCl-puffer für pH 8,0 und 9,0; 6 μ M MgCl_2 ; 6 μ M K_2 -Mg-ÄDTA; μ M Jodacetamid; 1 mg Serumalbumin; Vol = 0,6 ml.

O---O = GegePP-Synthetase: 0,98 mg Protein
Inkubation und Aufarbeitung wie in Abb.2

Δ --- Δ = FaPP-Synthetase: 29 μ g Protein
Start mit 0,3 μ M $(\text{NH}_4)_2$ Geranyl-pyrophosphat und 0,06 μ M K_2 -1- ^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM). Inkubation: 10 Min. bei 37°. Aufarbeitung wie in Abb.2 beschrieben

Die pH-Abhängigkeit der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase in derselben Proteinfraction (Δ --- Δ) zeigt eine ähnliche Charakteristik mit einem pH-Optimum bei 6,0.

b) Identität von Geranylgeranyl- mit Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase

Die Entdeckung des Bausteins und des mechanistischen Bauplans, nach dem die Terpene in der Natur durch Aneinanderfügen von C_5 -Einheiten aufgebaut werden, gibt den Anstoß zu weiteren Problemen:

Eine interessante Frage betrifft die Spezifität der Enzyme, die an der Kettenverlängerung des Dimethylallyl-pyrophosphats bis zu den Makromolekeln des Guttapercha und des Kautschuks¹⁾ beteiligt sind. Handelt es sich dabei um viele, hintereinandergeschaltete Enzyme mit relativ engem Spezifitätsbereich (spezifische Terpenyl-pyrophosphat-Synthetasen), oder um einige wenige Katalysatoren, die die Biosynthese ganzer Gruppen von Isoprenologen bewältigen können ("Polymerasen")? Im speziellen Fall der Biosynthese des Geranylgeranyl-pyrophosphats stellt sich die Frage, ob es sich hier um ein von der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase unabhängiges Enzym, oder nur um eine bisher verborgene katalytische Fähigkeit des selben Enzyms handelt.

Verschiedene Beobachtungen weisen auf die letztere Möglichkeit hin: Erstens besteht eine Parallelität in den Anreicherungswegen der beiden Enzyme (vgl.⁵⁾). Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten beider Enzymfunktionen auf den verschiedenen Stufen der Anreicherung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase zeigt, daß das Verhältnis annähernd konstant bleibt (siehe Tab.3 S.27).

Tabelle 3

Parallele Anreicherung der Geranyl-geranyl-
und Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase

Fraktion	Spez. Aktivitäten (. 10^{-3} E.E./mg)		Spez. Akt. FaPP-Synth.
	FaPP-	GegePP-Synth.	Spez. Akt. GegePP-Synth.
Toluolautoly- sat 1 kg Hefe, dialysiert	29,5	0,18	165
Filtrat der Säurefällung	34,0	0,25	136
Al(OH) ₃ -Gel- überstand	75,5	0,46	163
Ammonsulfat- fraktion (0,6-0,7 S.)	125,0	0,95	132

Für GegePP-Synthetase vgl. Tabelle 1, S.17.
Ansätze für FaPP-Synthetase wie in Abb.8, S.25,
40 uM K-PO₄-puffer pH 6,0 ca. 40 ug Protein von
jeder Fraktion. Inkubation und Aufarbeitung wie in
Abb.8 beschrieben.
Definition der Enzym-Einheit wie für die GegePP-
Synthetase (vgl.S.16)

Der ähnliche Verlauf der pH-Abhängigkeitskurven der
beiden Enzyme (vgl. Abb.8, S.25) stützt die Vermutung, daß
es sich um ein und dasselbe Enzym handelt. Weiterhin lie-
gen die Michaeliskonstanten für die drei "isoprenologen"
Substrate Dimethylallyl-, Geranyl- und Farnesyl-pyrophos-
phat bei pH 8,0 in derselben Größenordnung:

Substrat	K _M (M/l)
Dimethylallyl-PP ⁵⁾	1,0 . 10^{-4}
Geranyl-PP ⁵⁾	0,9 . 10^{-4}
Farnesyl-PP	0,8 . 10^{-4}

Auch die für die Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthe-
tase gemessene Michaeliskonstante für Isopentenyl-pyro-
phosphat ($6 \cdot 10^{-5}$ M/l vgl. S.22) unterscheidet sich

nur wenig von dem für die Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase angegebenen Wert ($K_M = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ M/l}$)⁵⁾.

Angenommen, die Biosynthese der Pyrophosphorsäureester des Geraniols, des Farnesols und des Geranylgeraniols werden von ein und demselben Enzym katalysiert, so müssen Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit der verschiedenen Substanzen durch Unterschiede in den zugehörigen Wechselzahlen bedingt sein.

Die nach Warburg⁵⁶⁾ definierten Wechselzahlen der einzelnen Reaktionsschritte sind nicht bekannt. Aber ein Vergleich der relativen Wechselzahlen des Enzyms für die drei verschiedenen Substrate ist möglich: nach Lynen et.al.⁵⁾ hat das Enzym mit Geranyl-pyrophosphat eine 3 mal größere Wechselzahl als mit Dimethylallyl-pyrophosphat. Aus Tabelle 3, S.27, ergibt sich ein mittleres Verhältnis der Wechselzahlen für Geranyl- zu Farnesyl-pyrophosphat von $F = \text{ca. } 150$. Auch in diesem Fall ist also das Geranyl-pyrophosphat das weitaus bevorzugte Substrat. Damit erklärt sich auch die Tatsache, daß bei der Inkubation von Isopentenyl-pyrophosphat mit Dimethylallyl-pyrophosphat im Verhältnis 1:1 nur Farnesyl-pyrophosphat isoliert werden kann:⁵⁾

Das intermediär auftretende Geranyl-pyrophosphat wird in der raschen Folgereaktion in Farnesyl-pyrophosphat eingebaut, das vergleichsweise sehr viel langsamer zum Geranylgeranyl-pyrophosphat weiter reagiert. Nur durch Zusatz von Dimethylallyl-pyrophosphat in großem Überschuß gelingt es, das Geranyl-pyrophosphat zu fassen. Ganz analog wird die Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat erst bei Zusatz von überschüssigem Farnesyl-pyrophosphat beobachtet.

Ein Vergleich der relativen Wechselzahlen des Enzyms für die drei isoprenologen Substrate führt deshalb zu einem interessanten Spezifitäts-Spektrum des Enzyms.

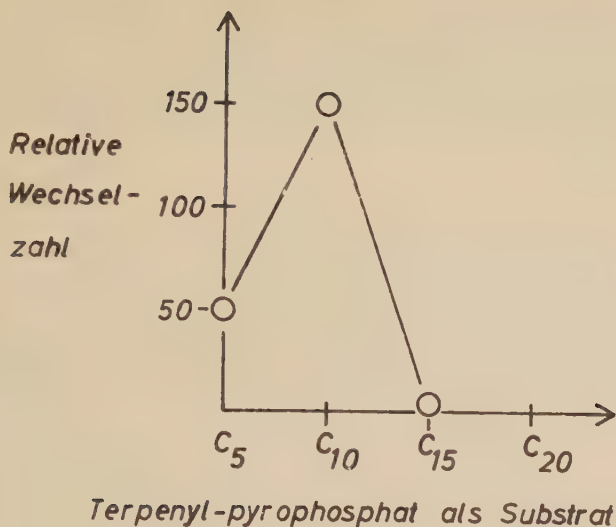


Abb.9: Spezifitäts-Spektrum der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

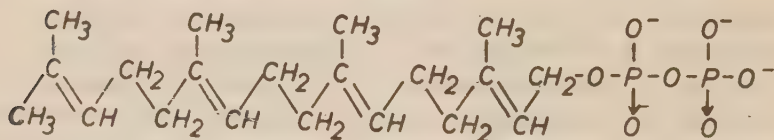
Eine Extrapolation dieser Ergebnisse macht es wahrscheinlich, daß die katalytischen Fähigkeiten des Hefe-Enzyms mit der Synthese des C₂₀-Pyrophosphats erschöpft sind. Zur Biosynthese höherer Polyterpenyl-pyrophosphate, wie z.B. C₃₀-Pyrophosphat, das zur Synthese des in der Hefe vorkommenden Coenzym Q₆ benötigt wird, wird sich die Bäckerhefe wahrscheinlich eines oder mehrerer anderer Enzyme bedienen. Wiederholte Versuche, bei der Inkubation von Farnesyl-pyrophosphat mit einem Überschuß von Isopentenyl-pyrophosphat die Synthese noch höherer Terpenyl-pyrophosphate --- etwa C₂₅- oder C₃₀-Körper --- nachzuweisen, sind mit der gereinigten Synthetase bisher noch nicht gelungen.

Der endgültige Beweis für die Identität der Geranyl-Farnesyl- und Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetasen muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben. Erst die Darstel-

lung des einheitlichen Enzyms wird die vorliegenden Ergebnisse endgültig bestätigen können. Es ist weiterhin möglich, daß sich die Spezifitätsbereiche der entsprechenden Enzyme anderer Organismen von denen in der Bäckerhefe unterscheiden.

3. Die Identifizierung des Reaktionsproduktes

Nach Ausarbeitung der optimalen Reaktionsbedingungen war es möglich, durch präparative Ansätze größere Mengen des Reaktionsproduktes zu isolieren, und seine Konstitutionsermittlung in Angriff zu nehmen. Bereits die Tatsache, daß die Verbindung durch Verknüpfung eines C_{15} - und eines C_5 - Bausteins gebildet wird, wie auch ihre Säurelabilität, laßen auf das höhere Isoprenologe (C_{20}) des Farnesyl-pyrophosphats schließen. Die folgenden Versuche erbrachten den schlüssigen Beweis, daß es sich tatsächlich um Geranyl-geranyl-pyrophosphat handelt:



a) Nachweis des Geranylgeranyl-Restes

Die papierchromatographische Analyse der durch Säurespaltung des Reaktionsproduktes erhaltenen Terpenalkohole wurde durch das von Kaufmann und Nitsch⁵⁷⁾ beschriebene Verfahren der Phasenumkehr-Papierchromatographie sehr erleichtert. Mit paraffiniertem Papier und Aceton/Wasser-Gemisch als Fließmittel konnten fast sämtliche Terpenalkohole zwischen C_{15} und C_{50} in relativ kurzer Zeit

getrennt werden. Sogar die Trennung der isomeren Allylalkohole untereinander wie z.B. Farnesol/Nerolidol oder Geranylgeraniol/Geranyllinalool bzw. die entsprechenden Isomerenpaare der C₂₅- und der C₃₀-Stufe, gelang mühelos.

Tabelle 4
R_F-Werte der isoprenologen Terpenalkohole

Terpenalkohol	Kettenlänge	R _F -Werte
Farnesol	C ₁₅	0,93
Nerolidol	C ₁₅	0,87
Geranylgeraniol	C ₂₀	0,83
Geranyllinalool	C ₂₀	0,74
Farnesylgeraniol	C ₂₅	0,70
Farnesyllinalool	C ₂₅	0,55
Farnesyolfarnesol	C ₃₀	0,52
Farnesylnerolidol	C ₃₀	0,36
Farnesylgeranyllinalool	C ₃₅	0,19
Farnesyolfarnesyllinalool	C ₄₀	0,10
Solanesol	C ₄₅	0,08
Farnesyolfarnesylgeranyllinalool	C ₅₀	0,02

Papier: S&S 2040 b, mit Paraffinöl getränkt.
Entwicklung mit 80 proz. Aceton, 3 Std., aufsteigend. Steighöhe: 25 cm

Die papierchromatographische Analyse der durch Säurespaltung des Reaktionsproduktes gewonnenen organischen Bruchstücke zeigte, daß ein Gemisch von vier verschiedenen Verbindungen vorlag (siehe Abb. 10 S. 32).

Durch Vergleich (Abb. 10 A) konnte das Hauptprodukt der Säurespaltung als Geranyllinalool (R_F = 0,74) und die etwas rascher wandernde Verbindung als Geranylgeraniol (R_F = 0,83) identifiziert werden. Die beiden Verbindungen

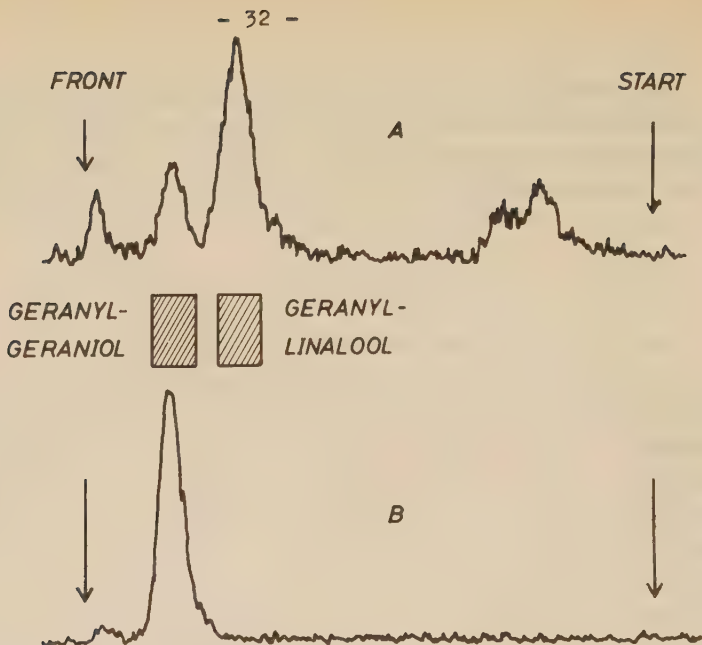
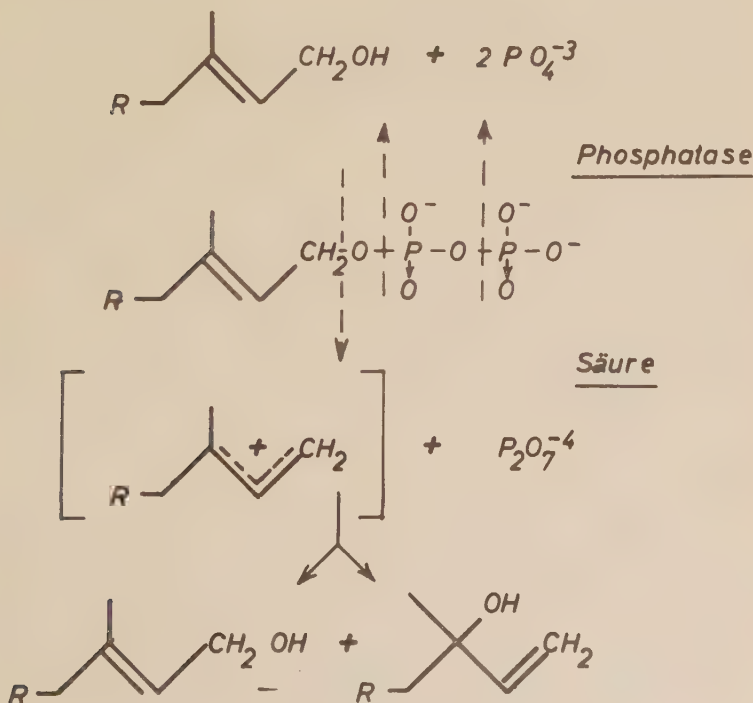


Abb.10: Papierchromatographie der durch säurekatalysierte (A) und phosphatische (B) Spaltung von 1-¹⁴C-Geranylgeranyl-pyrophosphat erhaltenen Terpene. Bedingungen der Papierchromatographie wie in Tabelle 4. Auswertung der getrockneten Papierstreifen im Radiopapierchromatograph. Die Lage der Vergleichssubstanzen ist schematisch wiedergegeben

entstehen etwa in dem gleichen Verhältnis (3:1) wie Nerolidol und Farnesol bei der Säurespaltung von Farnesylpyrophosphat²⁴⁾. Der kleine Gipfel, der fast mit der Lösungsmittelfront wandert, ist Farnesol, das wegen der unvollständigen Hemmung der Isomerase entsteht. Bei den zwei langsamer wandernden Verbindungen handelt es sich um die Methyläther des Geranylgeraniols ($R_f = 0,27$) und des Geranyllinalools ($R_f = 0,19$). Diese entstehen durch Methanolyse des Geranylgeranyl-pyrophosphats beim Ansäuern des mit methanolischer Kalilauge versetzten Reaktionsgemisches. Die beiden Methyläther und Geranyllinalool sind Artefakte

der säurekatalysierten Hydrolyse. Dies beweist die chromatographische Analyse des markierten Bruchstücks das durch quantitative phosphatatische Spaltung des Reaktionsprodukts erhalten wird (Abb.10 B). In diesem Fall ist das Geranylgeraniol ($R_f = 0,83$) das einzige radioaktive Derivat.

Die verschiedenen Reaktionsprodukte erklären sich aus dem Unterschied im Mechanismus, nach dem Phosphatase oder Protonen die Hydrolyse der C-O-P-Bindung des Allyl-pyrophosphorsäure-esters katalysieren⁵⁾; durch Phosphatase wird die Hydrolyse der O-P-Bindung katalysiert⁵⁸⁾, wobei die Struktur des Alkohols unverändert bleibt.

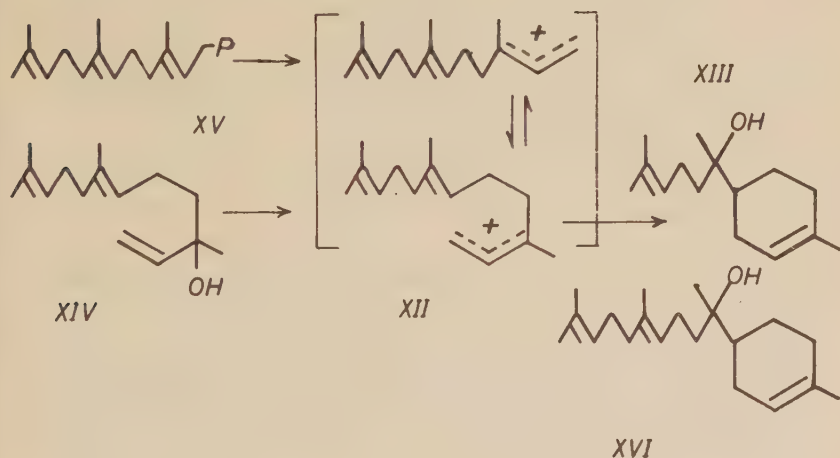


Die säurekatalysierte Hydrolyse von Phosphorsäureestern führt dagegen zur Spaltung der C-O-Bindung⁵⁹⁾. Im Spezialfalle der Allyl-pyrophosphate wird dieser Prozeß durch das resonanzfähige Allylsystem und durch die geringe Basizität des Pyrophosphat-rests, die durch Protonisierung im sauren Milieu sogar noch verringert wird, so stark begünstigt, daß die Hydrolyse schon bei Raumtemperatur außerordentlich rasch abläuft⁴⁵⁾. Das intermediär auftretende Allyl-carboniumion stabilisiert sich unter teilweiser Allylumlagerung durch Addition von Wasser oder Methanol zu den isomeren Allylalkoholen, bzw. den entsprechenden Methyläthern.

Die Identifizierung der beiden unbekannten, lipophilen Spaltprodukte der sauren Hydrolyse als die Methyläther des Geranylgeraniols und des Geranyllinalools stützt sich auf Versuche mit Farnesyl-phosphat, das als Modells substanz diente. Denn die säurekatalysierte Hydrolyse des Farnesyl-phosphats verläuft prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus wie die des Farnesyl- oder Geranylgeranyl-pyrophosphats: Biosynthetisch gewonnenes, radioaktives Farnesyl-pyrophosphat wird bei der Säurespaltung in 45 proz. Methanol zu Farnesol ($R_f = 0,93$) Nerolidol ($R_f = 0,87$) und zwei langsame wandernden Verbindungen ($R_f = 0,59$ bzw. $0,42$) gespalten; saure Hydrolyse von Farnesylphosphat führt unter gleichen Bedingungen zu denselben Verbindungen, die auf dem Chromatogramm durch Besprühen mit $KMnO_4$ -Lösung sichtbar gemacht werden können.

Wird nun die Hydrolyse durch Säure einmal in reinem Wasser, und andererseits in 95 proz. Methanol durchgeführt, erhält man entweder nur Farnesol/Nerolidol oder nur die beiden lipophileren Verbindungen. Dadurch wird die Vorstellung bewiesen, daß die prozentuale Verteilung auf die 4 verschiedenen Reaktionsprodukte nur von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängt: in reinem Methanol kann sich das Carboniumion eben nur durch Anlagerung von Methanol stabilisieren. In Methanol/Wasser 1:1 erhält man folgerichtig ein Gemisch von 4 Spaltprodukten. Dieser

Strukturbeweis wird noch durch ein zweites Indiz gestützt: Als alternative Möglichkeit zur Stabilisierung des Farnesyl-carboniumions (XII) gibt es die intramolekulare Cyklisierung zu Produkten vom Typus des α -Bisabolols (XIII). Tatsächlich entsteht diese Verbindung bei der Behandlung von Nerolidol (XIV) mit Säuren⁶⁰⁾, und es ist sehr wahrscheinlich, daß dabei die Stufe desselben Allyl-carboniumions durchlaufen wird:



Die Identität der zwei lipophileren Spaltstücke des Farnesylphosphats (XV) mit α -Bisabolol wurde jedoch durch papierchromatographischen Vergleich mit synthetischem α -Bisabolol ($R_f = 0,78$) ausgeschlossen. Ganz analog fiel der Vergleich mit dem isoprenologen Geranyl- α -Terpineol (XVI) ($R_f = 0,53$) aus, das sich deutlich von Geranyl-geranyl- und Geranyllinalyl-methyläther ($R_f = 0,27$ bzw. $0,19$) unterscheidet.

Diese Befunde werfen auch neues Licht auf die Untersuchungen Porters⁶¹⁾, der bei der Inkubation von 2-¹⁴C-

Mevalonsäure mit Rattenleberextrakten neben Farnesol und Geraniol 4 weitere, bisher unbekannte, bei der Säurehydrolyse freigesetzte Terpenderivate erhielt, die er als "Vorläufer des Squalens" ansprach. Da die papierchromatographische Analyse mit einem ähnlich leistungsfähigen System (paraffiniertes Papier, 85 proz. Eisessig als Fließmittel) ausgeführt wurde, ist es wahrscheinlich, daß Farnesol und Nerolidol als Spaltprodukte zweier verschiedener Squalenvorläufer gewertet wurden. Da die Säurespaltung der wasserlöslichen, intakten Verbindungen außerdem in 50 proz. Äthanol durchgeführt wurde, ist es ebenso wahrscheinlich, daß die dabei gebildeten Äthyläther des Farnesols und Nerolidols auf den Papierchromatogrammen als langsamer wandernde Verbindungen erschienen. Damit würde sich die Zahl der tatsächlich neu gefundenen Verbindungen von 4 auf nur eine reduzieren. Wenn man berücksichtigt, daß das in Rattenleber gebildete Geranyl-pyrophosphat unter denselben Spaltungsbedingungen ebenfalls zu einem Fächer von 4 "neuen" Verbindungen führen muß, erscheint die Zahl der auf den Chromatogrammen nachgewiesenen, radioaktiven Gipfel als mangelhaft. Zumindest wäre eine genauere Unterscheidung zwischen den bei der Säurehydrolyse entstandenen Artefakten und den tatsächlich neu gebildeten Terpenderivaten angebracht, um Verwirrungen zu vermeiden.

Die endgültige Identifizierung des durch phosphatatische Spaltung erhaltenen, radioaktiven Geranylgeraniols gelang durch Überführung in den kristallisierten 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-4-ester. Nach Zusatz von synthetischem Geranylgeraniol als Träger wurde der Alkohol nach der Methode von Hecker⁶²⁾ mit dem entsprechenden Säurechlorid in Pyridin/Benzol umgesetzt. Das als Träger benötigte Geranylgeraniol wurde aus synthetischem Geranyl-linalool⁴⁸⁾ nach der Methode von Ruzicka⁶³⁾ gewonnen. Beim Umkristallisieren des Esters aus n-Heptan stieg dessen spezifische Radioaktivität an und erreichte bald den theoretischen Wert (222 IpM/mg). Dieser wurde aus der eingesetzten Radioaktivität und dem zugegebenen Trägermaterial berechnet.

Tabelle 5

Umkristallisation des 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-4-esters des Geranylgeraniols bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität (Messung im Methan-Durchflußzähler).

Zahl der Umkristallisationen	Schmp.	Spez. Radioakt. (IpM/mg)
--	72-74°	126
1	76-77°	159
2	77-78°	202
3	80-81°	218
4	80-81°	193
5	81-82°	223
6	82-83°	207
7	82-83°	212

b) Nachweis des Pyrophosphat-Restes

In Analogie zu dem für die Biosynthese von Farnesyl-pyrophosphat geltenden Mechanismus war anzunehmen, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt von 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat und Farnesyl-pyrophosphat um den Pyrophosphorsäure-ester des Geranylgeraniols handelt. Verschiedene Eigenschaften der intakten Verbindung standen in bestem Einklang mit dieser Annahme: So teilte die markierte Verbindung nicht nur die Eigenschaft der Säurelabilität mit dem Farnesyl-pyrophosphat, sondern sie konnte auch mit Collidin extrahiert werden³⁾. Die auf diesem Wege gereinigte radioaktive Verbindung wanderte bei der Hochspannungspapierelektrophorese in Pyridin-acetat-puffer pH 6,2 langsamer zur Anode als Farnesyl-pyrophosphat, wodurch der Säurecharakter der Verbindung bewiesen wurde. Auch das papierchromatographische Verhalten der intakten, radioaktiven Verbindung in Collidin/Wasser (3:1) sprach für einen höheren Isoprenologen ($R_f = 0,52$) des Farnesyl-

pyrophosphats ($R_f = 0,45$) und des Geranyl-pyrophosphats ($R_f = 0,33$).

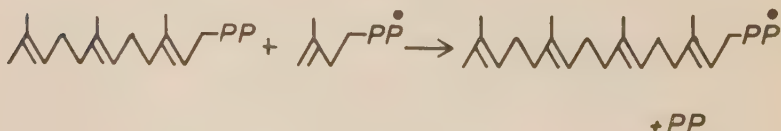
Tabelle 6

Papierchromatographie und Hochspannungspapierelektrophorese der Terpenyl-pyrophosphate

Substanz	Papierchromatographie Collidin/Wasser (3:1) R_f	Hochspannungspapierelektrophorese Pyridin/Eisessig/ Wasser (100:10:890) pH 6,2 R_{PO_4}
Anorg.Phosphat	0,09	= 1,00
Anorg.Pyrophosphat	0,00	0,80
Isopentenyl-PP	0,03	1,00
Geranyl-PP	0,33	0,80
Farnesyl-PP	0,45	0,68
Geranylgeranyl-PP	0,52	0,30

Papier: Schleicher & Schüll 2040 b (mit HCl gewaschen).
 R_{PO_4} = relative Wanderungsstrecke in Einheiten der Wanderungsstrecke von anorg.Phosphat

Der Nachweis des Pyrophosphat-Rests konnte schließlich mit Hilfe der ^{32}P -markierten Verbindung erbracht werden. Diese wurde durch Inkubation von endständig mit ^{32}P -markiertem Isopentenyl-pyrophosphat und Farnesyl-pyrophosphat erhalten:



Das radioaktive Reaktionsprodukt wurde durch Extraktion mit Collidin isoliert, der Papierchromatographie unterwor-

fen und auf diese Weise von störendem, radioaktivem Isopentenyl-pyrophosphat und anorg. Phosphat befreit.

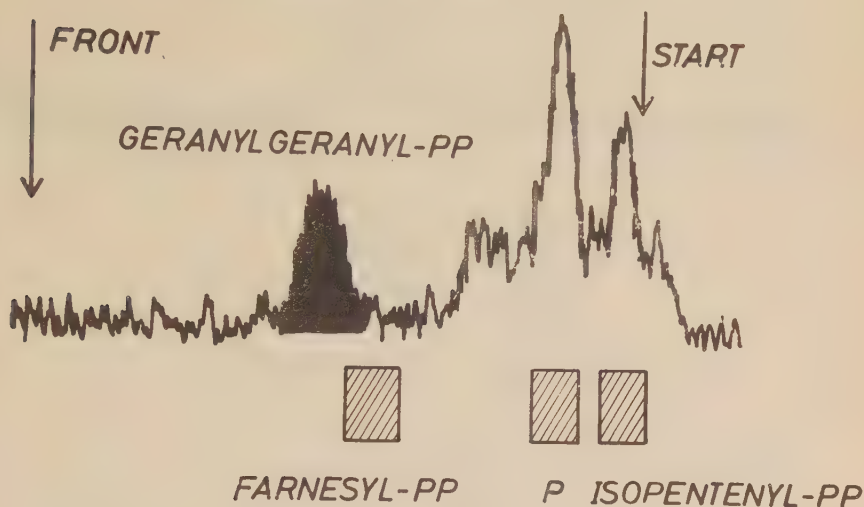


Abb. 11: Papierchromatographische Reinigung von ^{32}P -Geranylgeranyl-pyrophosphat. Bedingungen der Papierchromatographie wie in Tabelle 6 (Front = 20 cm). Auswertung des Papierstreifens im Radio-papierchromatographen. Die Lage der Vergleichssubstanzen ist schematisch wiedergegeben

Die Zone des Geranylgeranyl-pyrophosphats wurde eluiert und gefriergetrocknet. Die gereinigte Verbindung lieferte nach der Behandlung mit 1,5 m Trichloressigsäure ein radioaktives, wasserlösliches Spaltstück, das bei der papierchromatographischen Analyse zusammen mit anorg. Pyrophosphat ($R_f = 0,50$) wanderte. Der Fleck des Orthophosphats ($R_f = 0,72$) war praktisch frei von Radioaktivität.

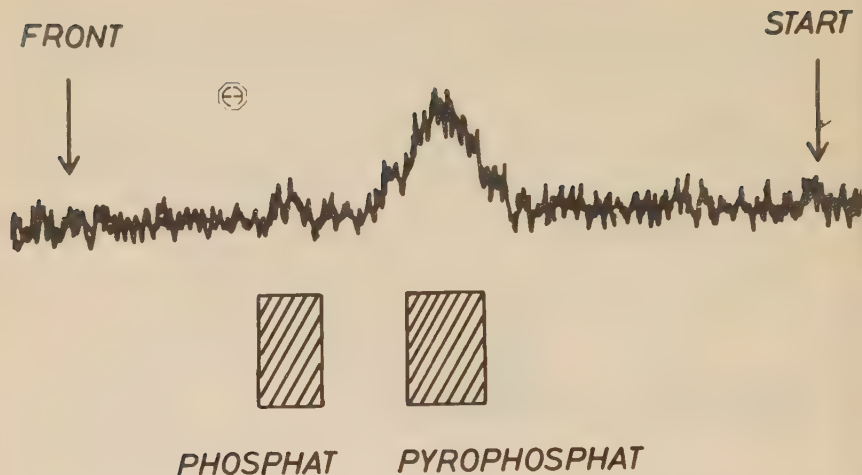


Abb.12: Papierchromatographischer Nachweis des Pyrophosphat-Restes

Papier: Schleicher & Schüll 2040 b (mit HCl gewaschen).

Fließmittel: Isopropanol/Trichloressigsäure/Wasser/konz.NH₃ (70:30:5:0,3)⁶⁴. 12 Std. aufsteigend entwickelt, Front = 26 cm.

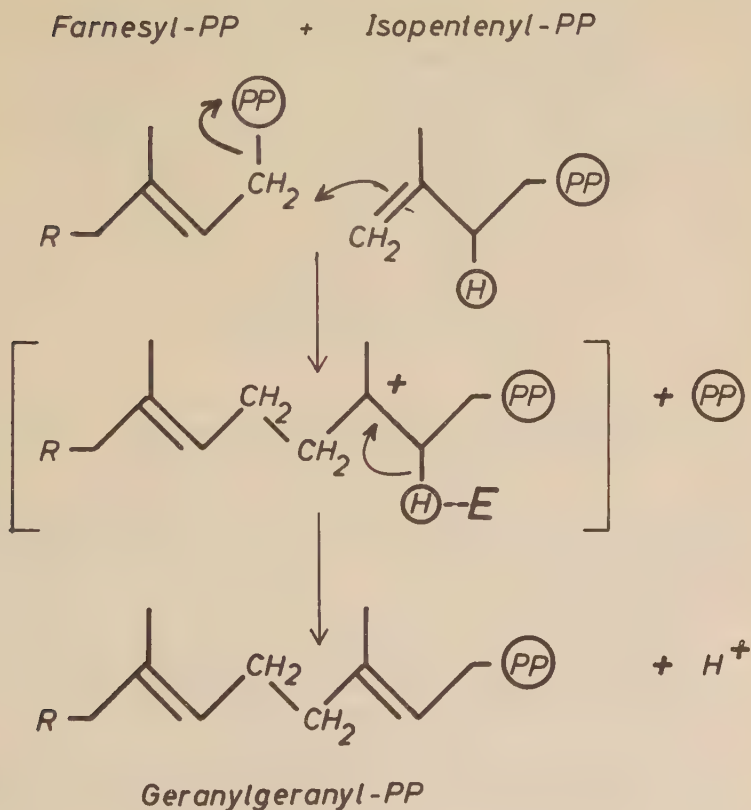
Auswertung des getrockneten Papierstreifens im Radiochromatographen. Die Lage der Vergleichssubstanzen ist schematisch wiedergegeben

4. Der Reaktionsmechanismus

Die Zusammenfassung der im Vorhergehenden beschriebenen Ergebnisse gestattet es, den Reaktionsmechanismus für die Biosynthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat aufzustellen:

Farnesyl-pyrophosphat reagiert mit Isopentenyl-pyrophosphat im Verhältnis 1:1 zum isoprenologen Geranylgeranyl-pyrophosphat. Das Reaktionsprodukt besitzt dieselbe, säurelabile Allyl-pyrophosphat-Gruppe wie das

Farnesyl-pyrophosphat und enthält den Pyrophosphat-Rest des Isopentenyl-pyrophosphats.



Die Reaktion läßt sich also als Alkylierung der nukleophilen Doppelbindung des Isopentenyl-pyrophosphats mit dem elektrophilen Farnesyl-pyrophosphat auffassen. Dabei wird die Pyrophosphorsäure-ester-Gruppe des Farnesyl-pyrophosphats wahrscheinlich als anorg. Pyrophosphat abgespalten. Das im Zuge der Alkylierung entstehende,

tertiäre Carboniumion wird durch Abspaltung eines Protons stabilisiert, wobei das Enzym diese Eliminierung so lenkt, daß wieder eine Allyl-pyrophosphat-Gruppe (wahrscheinlich mit einer trans-konfigurierten Doppelbindung) gebildet wird.

Dies stimmt in jeder Hinsicht mit dem von Lynen et. al. ⁵⁾ vorgeschlagenen Mechanismus für die Biosynthese von Farnesyl- und Geranyl-pyrophosphat überein, und unterstreicht damit die Rolle, die die Allyl-pyrophosphate bei der Biosynthese der Terpene spielen.

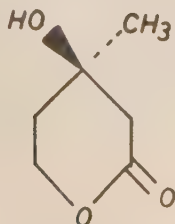
II. Die Hemmung der Squalensynthese durch 2- und 3'-Fluormevalonsäure

1. Die Biosynthese der 5-Pyrophospho-2- Fluormevalonsäure

a) Die enzymatische Phosphorylierung der 2-Fluormevalonsäure

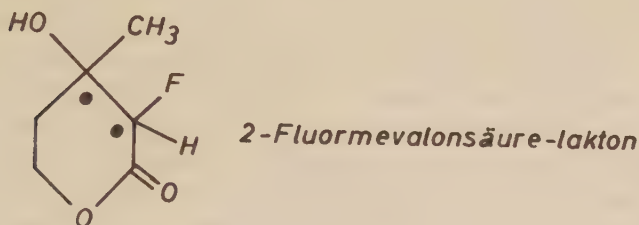
Die Mevalonsäure besitzt ein asymmetrisches C-Atom, und kommt deshalb in Form zweier optisch aktiver Antipoden vor. Biologische Systeme können jedoch nur ein Enantiomeres für die Synthese von Squalen verwerten ⁶⁵⁾.

Vor kurzem hat Arigoni ⁶⁶⁾ die absolute Konfiguration der natürlichen Mevalonsäure ermittelt: Wie er fand, handelt es sich um die nach Cahn et.al. ⁶⁷⁾ definierte R-Form, deren Laktone die Ebene des polarisierten Lichts nach links, während das Dibenzyläthylen-diammoniumsalz nach rechts dreht ⁶⁸⁾.



R-Mevalonsäurelaktone

Durch Einfügung eines Fluoratoms am Kohlenstoffatom C₂ des Mevalonsäuregerüsts entsteht ein zweites Asymmetriezentrum, wodurch die Zahl der möglichen Stereoisomeren auf 4 erhöht wird, die zusammen zwei diastereomere Paare bilden:



Tatsächlich kann das Dibenzyläthylen-diammoniumsalz der 2-Fluormevalonsäure auf Grund verschiedener Löslichkeit in zwei optisch inaktive D,L-Racematenpaare getrennt werden, die einen erheblichen Unterschied im Schmelzpunkt aufweisen⁶⁹⁾. Die den Salzen entsprechenden γ -Laktone unterscheiden sich ebenfalls auffallend in ihren physikalischen Eigenschaften:

<u>Form</u>	<u>DBÄD - Salz</u>	<u>γ- Laktone</u>
A	fb1.Krist.Schmp. = 148 - 149°	fb1.Öl Sdp _{10 mm} -2 = 110 - 114°
B	fb1.Krist.Schmp. = 118 - 119°	fb1.Krist.Schmp. ₀ = 92 - 94°

Das Problem der Wirkung der 2-Fluormevalonsäure auf die Cholesterinsynthese wird also durch das Vorliegen von 4 verschiedenen stereo-isomeren Individuen kompliziert.

Zur Orientierung wurde deshalb zuerst die mögliche Hemmwirkung der beiden Formen der 2-Fluormevalonsäure auf die Biosynthese des Squalens qualitativ untersucht. (Dieser Vorversuch wurde von Herrn Dr.Henning und Fr1. J.Kessel durchgeführt).

Bei der Biosynthese des Squalens aus Mevaldinsäure^{70,71)} (vgl. Schema 4) wird die Stufe der Mevalonsäure durchlaufen. Da eine eventuelle Hemmung der Squalensynthese durch die fluorierte Mevalonsäure erst in den anschließenden Reaktionsschritten zu erwarten war, stellte die Biosynthese aus Mevaldinsäure das geeignete System zum Studium dieser Hemmwirkung dar.

Die Biosynthese des Squalens aus Mevaldinsäure wird durch rohe Homogenate aus Bäckerhefe katalysiert, wie sie durch hochfrequentes Schütteln der Zellen mit Glasperlen erhältlich sind. Unter Zusatz von ATP als energiespendendes und TPNH als reduzierendes System, kann man die Synthese von radioaktivem Squalen aus 2-¹⁴C-Mevaldinsäure durch Bestimmung der Radioaktivität in der Fraktion der unverseifbaren, petrolätherlöslichen Lipide verfolgen. Tatsächlich wird die Squalensynthese durch Zusatz von 2-Fluormevalonsäure gehemmt:

Tabelle 7
Hemmung der Squalensynthese aus 2-¹⁴C-Mevaldinsäure
durch 2-Fluormevalonsäure

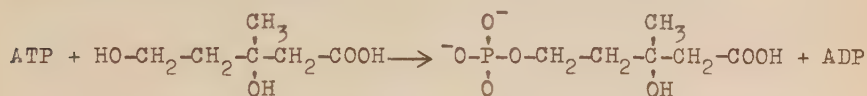
Zusätze	IpM im Squalen	Hemmung %
---	650	---
0,5 uM 2-FMVS (A)	90	86
0,5 uM 2-FMVS (B)	450	31
0,5 uM MVS	90	86

Ansätze: 20 uM KH₂PO₄; 30 uM KF; 6 uM MgCl₂; 0,1 uM TPNH; 2 uM ATP; 2 mg Stärke; 0,1 uM²; 2-¹⁴C-Mevaldinsäure (K-salz) (1690 IpM) und Zusätze wie in der Tabelle. Start mit 0,2 ml Homogenat. Vol = 0,6 ml. Inkubation: 2 Std. bei 37°C. Nach Zusatz von Squalen als Träger, Extraktion mit Petroläther, Wäsche mit KOH, Zählung auf Cu-plättchen.

Wie man aus Tabelle 7 sieht, unterscheiden sich die beiden Racematenpaare wesentlich in ihrer Hemmwirkung. Die aktive A-Form (Schmp. 148 - 149°) verhält sich dabei

wie die natürliche Zwischenstufe, Mevalonsäure. Da die "Hemmwirkung" der Mevalonsäure auf einen Isotopenverdünnungseffekt zurückzuführen ist, lag der Verdacht nahe, daß die aktive Form der 2-Fluormevalonsäure ebenfalls ein Substrat für die anschließenden Reaktionsschritte darstellen könnte. Diese Annahme stand auch in Einklang mit dem von Langdon⁴³⁾ beobachteten Einbau des Fluoracetats in die Fraktion der unverseifbaren Lipide, der ja über die Stufe fluorierter Mevalonsäuren führen muß.

Um den Angriffspunkt des Mevalonsäure-antimetaboliten in der Enzymkette, die die Umwandlung von Mevalonsäure zum Squalen katalysiert, zu lokalisieren, wurde die Wirkung der aktiven 2-Fluormevalonsäure (A) auf den ersten Reaktionsschritt untersucht. Hier wird die Mevalonsäure unter Katalyse der Mevalonatkinase^{71,72,73)} mit ATP zur 5-Phosphomevalonsäure phosphoryliert: (vgl. Schema 4)



Die Kinetik der Reaktion kann mit Hilfe der Isotopenmethode bequem verfolgt werden: Die aus 2-¹⁴C-Mevalonsäure gebildete 2-¹⁴C-Phosphomevalonsäure wird nach Abbruch der Reaktion durch Perforation des angesäuerten Reaktionsgemisches mit Äther von überschüssiger Mevalonsäure befreit und anschließend ausgezählt. Ein solcher Versuch zeigte, daß Zusätze steigender Mengen 2-Fluormevalonsäure die Synthese radioaktiver Phosphomevalonsäure im Sinne einer kompetitiven Hemmung unterdrücken: (Tabelle 8 siehe S.46)

Damit war der Ort der Hemmung der 2-Fluormevalonsäure auf die Mevalonsäurekinase festgelegt. Um die Frage zu entscheiden, ob die demonstrierte Hemmung der Mevalonsäurekinase eine unspezifische Blockierung des Enzyms darstellt, oder ob sie auf einer aktiven Konkurrenz des Antimetaboliten mit dem natürlichen Substrat beruht, wurden beide Racematenpaare der 2-Fluormevalonsäure als Sub-

Tabelle 8

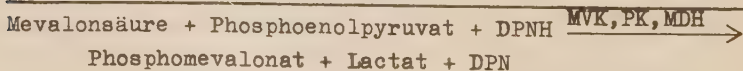
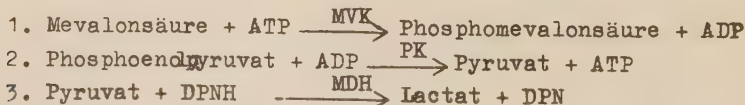
Die Hemmwirkung der 2-Fluormevalonsäure auf die enzymatische Phosphorylierung der Mevalonsäure

uM D,L 2-Fluormevalon- säure zugesetzt	IpM in Phospho- mevalonsäure
---	363
0,02	363
0,04	348
0,08	302
0,16	166

Ansätze: 60 uM KHCO_3 ; 30 uM KF; 2 uM ATP; 6 uM MgCl_2 ; 6 uM $\text{K}_2\text{Mg-ÄDTA}$; 1 mg Serumalbumin; 0,04 uM D,L-K-2- ^{14}C -Mevalonat (1120 IpM) und Zusätze von D,L-K-2-Fluormevalonat (A) wie in der Tabelle. Start mit Mevalonatkinase (10 ug Protein), Vol. = 0,6 ml. Inkubation: 40 Min. bei 37°. Stop mit 0,1 ml 3 m Trichloressigsäure; nach Perforation mit Äther ausgezählt.

strate im optischen Test für die Mevalonatkinase (MVK) eingesetzt.

In diesem kombinierten Test wird die Phosphorylierung der Mevalonsäure an der Bildungsgeschwindigkeit des Reaktionsprodukts ADP verfolgt. Die Bildung von ADP wird mit dem Hilffsystem Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase (PK) und DPNH/Milchsäuredehydrogenase (MDH) an die Dehydrierung von DPNH gekoppelt, dessen Extinktionsabnahme bei 366 mμ spektrophotometrisch gemessen werden kann (vgl.28):



Ersetzt man nun die Mevalonsäure im optischen Test durch das eine oder das andere der beiden Racematenpaare

der 2-Fluormevalonsäure, so zeigt sich, daß nur eine der beiden Formen phosphoryliert wird: Abb.13 illustriert, daß 2-Fluormevalonsäure (A) mit etwa der gleichen Geschwindigkeit phosphoryliert wird wie eine äquivalente Menge Mevalonsäure unter denselben Bedingungen, während die B-Form keinen Lauf verursacht und auch die Phosphorylierung des natürlichen Substrats nicht hemmt:

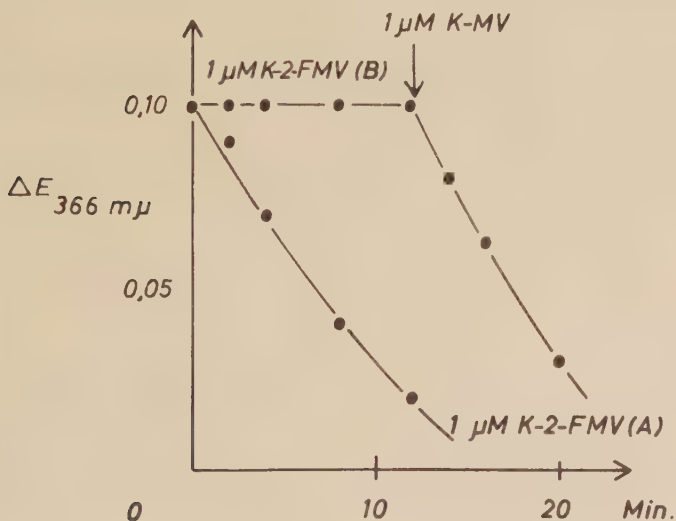
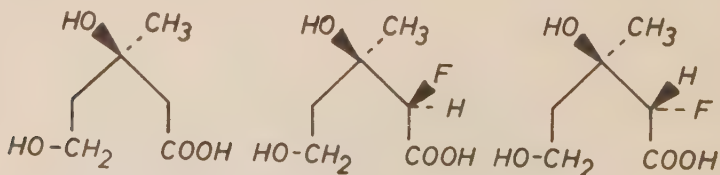


Abb.13: Die enzymatische Phosphorylierung der 2-Fluormevalonsäure

Ansätze: 300 μM TRAM/HCl-puffer, pH 7,5; 40 μM MgCl₂; 160 μM KCl; 1 μM K-Phosphoenolpyruvat; 1 μM ATP, 0,5 μM DPNH; 1 mg Serumalbumin; 25 μg Milchsäuredehydrogenase; 10 μg Pyruvatkinase; 40 μg Mevalonatkinase. Vol. 1,8 ml. Start mit je 1 μM D,L-K-2-Fluormevalonat (A) bzw. (B) und D,L-K-Mevalonat (↓) Temp. = 25°, d = 1cm; λ = 366 mμ, Messung gegen Blindküvette ohne Substrate.

Dieses Ergebnis deckt sich einerseits mit der im Vorversuch gefundenen, sehr viel geringeren Hemmwirkung der B-Form auf die Squalensynthese (vgl. S.44). Andererseits zeigt der Versuch, daß sich die Hemmwirkung der A-Form der 2-Fluormevalonsäure auf die Mevalonatkinase von der gewöhnlichen Form der kompetitiven Hemmung unterscheidet: Der Hemmstoff konkurriert nicht nur mit dem natürlichen Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms, sondern tritt selbst in die Reaktion ein. Das Gleiche würde man z.B. bei der Messung des Glucoseverbrauchs durch die Hexokinase-Reaktion beobachten, wenn eine Mischung von Glucose und Fructose vorgelegt wird, die beide von der Hexokinase umgesetzt werden⁷⁴⁾.

Unter Anwendung des optischen Tests konnte auch die Stöchiometrie der Phosphorylierung der 2-Fluormevalonsäure quantitativ gemessen werden. Dabei zeigte sich, daß pro Mol D,L-2-Fluormevalonsäure (A) nur 0,5 Mol ATP verbraucht werden. Dies entspricht genau dem Verhalten synthetischer D,L-Mevalonsäure, bei der nur ein Enantiomeres phosphoryliert wird^{65,73)}. Insgesamt wird also nur eines der 4 Stereoisomeren der 2-Fluormevalonsäure enzymatisch phosphoryliert. Vermutlich handelt es sich dabei um eines der beiden Diastereomeren, die am β -Kohlenstoffatom dieselbe R-Konfiguration wie das natürliche Enantiomere der Mevalonsäure besitzen.



R-Mevalonsäure

S-2-Fluor-

R-2-Fluor-

R-Mevalonsäure *R*-Mevalonsäure

Zusätzlich zu der absoluten Stereospezifität, die die Mevalonatkinase bezüglich des β -Kohlenstoffatoms entfaltet, erscheint bei der 2-Fluormevalonsäure eine zweite, beim natürlichen Substrat latente, absolute Stereospezifität bezüglich des Kohlenstoffatoms C_2 . Durch den Ersatz eines Wasserstoff-Atoms an C_2 der Mevalonsäure durch einen Fluorsubstituenten wird die Molekel in dreierlei Hinsicht verändert: Für die Erklärung der dadurch offenbarten Selektivität des Enzyms bezüglich des α -Kohlenstoffatoms scheidet die durch den Fluorsubstituenten bewirkte Polarisierung der Karboxylgruppe aus, denn eine Form der 2-Fluormevalonsäure wird ja tatsächlich phosphoryliert. Auch sterische Effekte spielen bei der relativ geringen Raumbeanspruchung des Fluorsubstituenten wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle. Bedeutsam erscheint jedoch die Tatsache, daß beim Ersatz eines Wasserstoffatoms durch Fluor ein Wasserstoff-Brückendonator gegen einen starken Wasserstoffbrücken-acceptor ausgetauscht wird. Es liegt deshalb nahe, die strenge Selektivität der Mevalonatkinase für nur ein Diastereomeres der 2-Fluormevalonsäure mit dieser radikalen Umpolung des Wasserstoffbrückencharakters in Zusammenhang zu bringen. Daraus würde sich die interessante Folgerung ergeben, daß eines der beiden Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom C_2 der Mevalonsäure über eine Wasserstoffbrückenbindung am aktiven Zentrum des Enzyms verankert wird, während das andere bei der Enzym-Substrat-Bindung keine Rolle spielt, und deshalb auch ohne Aktivitätsverlust durch Fluor substituiert werden kann.

Mit Hilfe des optischen Tests wurde auch die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration sowohl für 2-Fluormevalonsäure als auch für Mevalonsäure gemessen. Abb.14 (siehe S.50) gibt die gemessene Substratabhängigkeiten in Form des Lineweaver-Burk-Diagrammes⁵⁵⁾ wieder.

Wie aus dem Vergleich der aus den Geraden extrapolierten Michaeliskonstanten hervorgeht, stellt die Mevalonsäure ($K_M = 1 \cdot 10^{-4}$ M/l) mit einer etwa dreimal kleineren

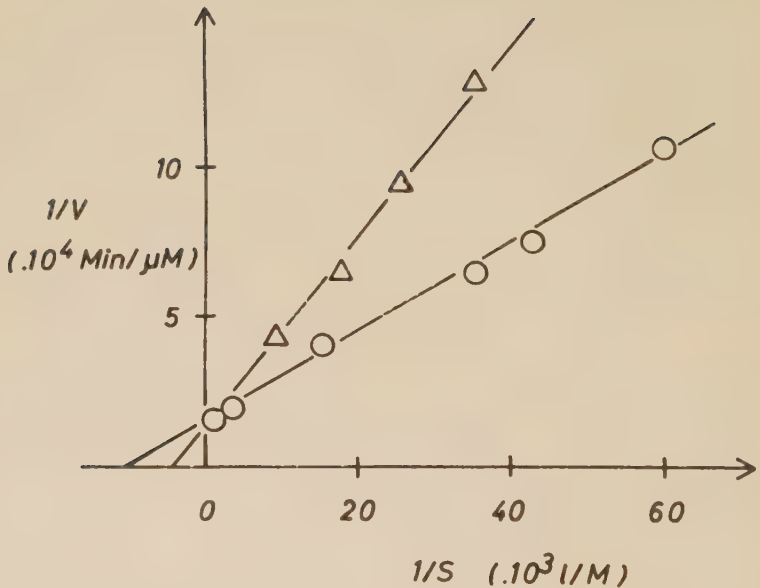


Abb.14: Substratabhängigkeit der Mevalonatkinase für D,L-Mevalonsäure und D,L-2-Fluor-mevalonsäure

Bedingungen des opt. Tests wie in Abb.13. die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Extinktionsabnahme graphisch extrapoliert.

O---O = D,L-K-Mevalonat

Δ---Δ = D,L-K-2-Fluormevalonat (Δ)

K_M gegenüber der 2-Fluormevalonsäure ($K_M = 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$) das bevorzugte Substrat dar. In diesem Unterschied allein wirkt sich die Einführung des Fluorsubstituenten aus. Im Sättigungsbereich (Abschnitt auf der Ordinate) werden beide Substrate mit praktisch der gleichen Geschwindigkeit umgesetzt, d.h. das Enzym hat für beide Substrate die gleiche Wechselzahl.

Zur Identifizierung des neuen, phosphorylierten Produkts wurde die 2-Fluormevalonsäure (A) mit AT^{32}P und Mevalonatkinase in präparativem Maßstab inkubiert. In ca. 90% Ausbeute bildete sich die neue, radioaktive Verbindung, die durch anschließende Hochspannungs-Papier-elektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 6,2 und durch präparative Papierchromatographie in 2 verschiedenen Fließmitteln von anorg. Phosphat, Ausgangsmaterial (dem inaktiven Diastereomeren), Nukleotiden und anderen Verunreinigungen befreit werden konnte.

Tabelle 9

Hochspannungs-Papierelektrophorese und Papierchromatographie der 2-Fluormevalonsäure und der 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure

Substanz	Hochspannungs-papierelektrophorese		Papierchromatographie		
	pH 6,2 (R_{PO_4})	pH 4,8	Methanol/ konz.NH ₃ / Wasser (6:1:3) (R_f)	Äthanol/ konz.NH ₃ / Wasser (8:1:1) (R_{PO_4})	tert.Amyl- alkohol/ Eisessig/ H ₂ O (4:1:2) (R_{PO_4})
Mevalon-säure	0,84	0,67	0,82	---	---
2-Fluormeva-lonsäure	0,88	0,82	0,81	---	---
5-Phosphome-valonsäure	1,12	0,96	0,56	2,42	1,03
5-Phospho-2-Fluormevalon-säure	1,12	1,06	0,52	1,85	0,96
anorg.Phos-phat	= 1,00	= 1,00	0,35	= 1,00	= 1,00
anorg.Pyro-phosphat	1,15	---	---	---	---
AMP	0,75	---	0,28	0,91	0,53
ADP	0,65	---	0,19	0,43	0,39
ATP	0,49	---	0,15	0,21	0,19
Isopentenyl-PP	0,82	---	0,42	2,20	1,16

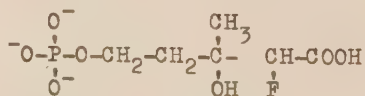
Elektrophorese: Macherey & Nagel-Papier 214; Puffer pH 6,2 Pyridin/Eisessig/Wasser (100:10:890), pH 4,8 Pyridin/Eisessig/Wasser (55:55:890); 30-40 V/cm; 80-90 mA 2 Std. Papierchromatographie: Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen)

Wie man aus Tabelle 9 ersieht, wandert die Phospho-2-Fluormevalonsäure identisch mit der Phosphomevalonsäure bei der Hochspannungspapier-Elektrophorese in Pyridin-Acetatpuffer pH 6,2. In stärker saurem Puffer (pH 4,8) wandert sie jedoch rascher, was wahrscheinlich auf die stärkere Dissoziation der Carboxylgruppe der Phospho-2-Fluormevalonsäure zurückzuführen ist. Demselben Phänomen begegnet man bei der Elektrophorese der zugrunde liegenden Säuren: auch hier wandert die fluorierte Mevalonsäure in dem sauren Puffer rascher als die Mevalonsäure selbst. Die stärkere Säurenatur der fluorierten Verbindungen ist wahrscheinlich auf den induktiven Effekt der 2-Fluorgruppe zurückzuführen: Ähnlich wie in dem Modellpaar Essigsäure/Fluoressigsäure sollte die Einführung des 2-Fluorsubstituenten zu einer Verminderung des P_K -Wertes führen (Essigsäure $P_K = 4,67$; Fluoressigsäure $P_K = 2,66^{75}$).

Bei der Papierchromatographie in verschiedenen Fließmitteln zeigt sich, daß die Einführung des Fluorsubstituenten eine geringe Erhöhung des hydrophilen Charakters bewirkt; Phospho-2-Fluormevalonsäure wandert in der Regel langsamer als die Phosphomevalonsäure.

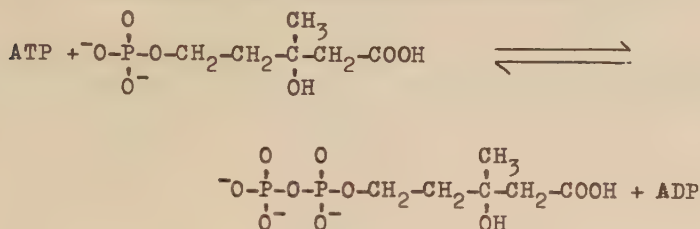
In chemischer Hinsicht verhält sich die neue Verbindung genau wie Phosphomevalonsäure: so wird bei der Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° nach 7 Min. noch kein anorg. Phosphat abgespalten. Auch gegenüber neutraler $KMnO_4$ -Lösung ist die Verbindung völlig stabil, in Übereinstimmung mit dem Verhalten der Phosphomevalonsäure unter identischen Bedingungen⁷⁶).

Durch diese Reihe von Indizien dürfte die Konstitution der neuen Verbindung als 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure hinreichend gesichert sein:



b) Die enzymatische Phosphorylierung der 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure

Auf dem Wege von der Mevalonsäure zum Squalen folgt der ersten Phosphorylierung der Mevalonsäure zur Phosphomevalonsäure eine zweite Phosphorylierungsreaktion (vgl. Schema 4): 5-Phosphomevalonsäure wird mit ATP in Gegenwart der Phosphomevalonatkinase in einer reversiblen Reaktion zur 5-Pyrophosphomevalonsäure weiterphosphoryliert^{2,28,29,30}).



Nachdem es gelungen war, die enzymatische Phosphorylierung der 2-Fluormevalonsäure zu Phospho-2-Fluormevalonsäure nachzuweisen, ergab sich die Frage, ob letztere Verbindung auch für die Phosphomevalonatkinase als Substrat dienen könne. Dazu wurden unmarkiertes Phospho-2-Fluormevalonat und 2-¹⁴C-Phosphomevalonat in präparativen Mengen nach dem oben beschriebenen Verfahren dargestellt. Mit der von Henning²⁸⁾ angereicherten Phosphomevalonatkinase wurde zuerst die Wirkung zunehmender Mengen Phospho-2-Fluormevalonsäure auf die Pyrophosphoylierung von 2-¹⁴C-Phosphomevalonsäure untersucht.

Um die Kinetik der Reaktion verfolgen zu können, wurden gereinigte Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase, Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase und Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase als Hilfsenzyme eingesetzt. Dadurch wird das Reaktionsprodukt Pyrophosphomevalonsäure in den Folgereaktionen rasch in säurelabile Produkte vom Typus des Dimethyl-allyl-pyrophosphats überführt, die nach dem Ansäuern des Ansatzes mit Äther extrahiert werden können. Unverwandelter Ausgangsmaterial kann dann im wässrigen Rück-

stand bestimmt werden. Führt man diesen Versuch unter Zusatz steigender Mengen Phospho-2-Fluormevalonsäure durch, so ergibt sich, wie aus Tabelle 10 ersichtlich, daß die Phospho-2-Fluormevalonsäure wiederum als kompetitiver Hemmstoff wirkt:

Tabelle 10

Die Hemmwirkung der Phospho-2-Fluormevalonsäure auf die enzymatische Phosphorylierung der Phosphomevalonsäure

muM Phospho-2-Fluormevalonsäure zugesetzt	2- ¹⁴ C-Phosphomevalonsäure umgesetzt (IpM)
-----	771
3,3	684
6,6	593
13,2	299
26,4	211

Ansätze: 20 uM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; 20 uM KF;
6 uM MgCl₂; 6 uM K₂-Mg-ADTA; 2 uM ATP; 7 muM K₃-
2-¹⁴C-Phosphomevalonat (930 IpM); Zusätze von
K₃-Phospho-2-Fluormevalonat wie in der Tabelle.
Völ. = 0,6 ml. Start mit Enzymgemisch (0,6 mg Protein)
Inkubation: 10 Min. bei 37°. Stop mit 0,1 ml
3 m Trichloressigsäure. Nach dem Ausäthern gezählt.

Um auch hier die Frage zu entscheiden, ob es sich bei der Hemmung der Phosphomevalonatskinase um eine passive Blockierung des Enzyms, oder vielmehr um die Verdrängung durch gleichzeitig reagierende Phospho-2-Fluormevalonsäure handelte, wurde die Verbindung im optischen Test für die gereinigte Phosphomevalonatskinase (PMVK) eingesetzt. Da auch dieser Test auf der Bestimmung des gebildeten ADP aufbaut, entspricht er genau den Testbedingungen für die Mevalonatskinase, mit dem Unterschied,

daß nun sinngemäß die Phosphomevalonsäure als Substrat eingesetzt wird:

1. Phosphomevalonsäure + ATP $\xrightarrow{\text{PMVK}}$ Pyrophosphomevalonsäure + ADP
2. Phosphoenolpyruvat + ADP $\xrightarrow{\text{PK}}$ Pyruvat + ATP
3. Pyruvat + DPNH $\xrightarrow{\text{MDH}}$ Lactat + DPN

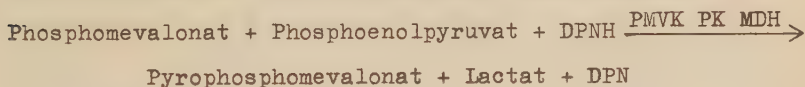


Abb.15 zeigt, daß die Extinktion bei 366 mμ nach Zusatz der fluorierten Verbindung fast genauso rasch abnimmt, wie mit dem natürlichen Substrat:

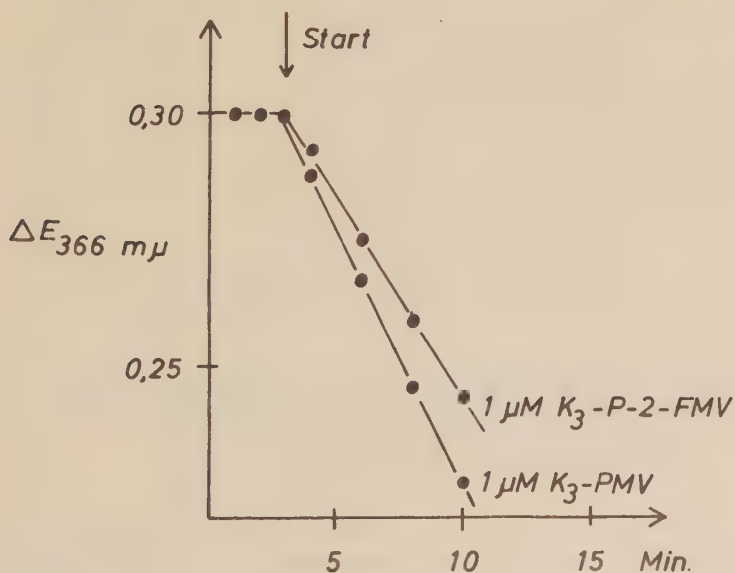


Abb.15: Phospho-2-Fluormevalonsäure als Substrat für die Phosphomevalonatkinase

Bedingungen des optischen Tests wie in Abb.13, 0,44 mg Phosphomevalonatkinase

Es gelang auch hier, mit Hilfe des optischen Tests, die Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der beiden Substrate zu bestimmen. Abb.16 gibt die Substratabhängigkeiten in Lineweaver-Burk-Koordinaten wieder:

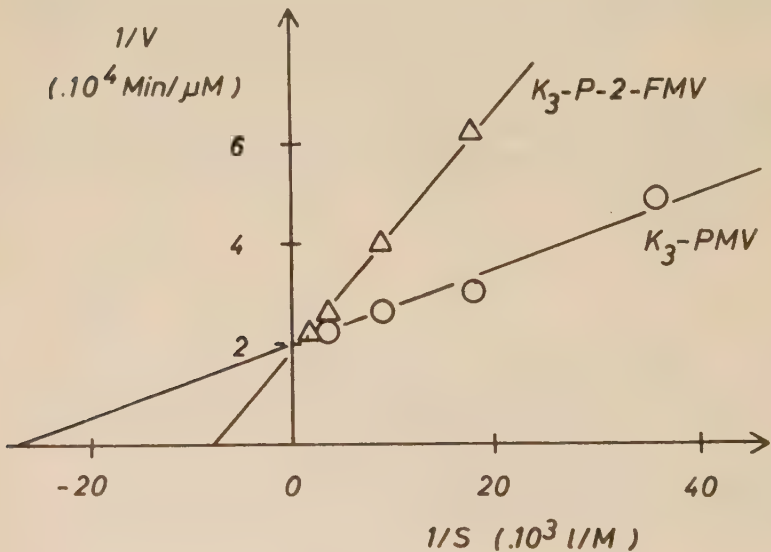


Abb.16: Substratabhängigkeit der Phosphomevalonatkinase für Phosphomevalonsäure und Phospho-2-Fluor-mevalonsäure
Bedingungen des optischen Tests wie in Abb.15

In Analogie zur Mevalonatkinase-Reaktion ist auch hier das natürliche Substrat, die Phosphomevalonsäure, mit einer rund 3 mal kleineren Michaeliskonstante ($K_M = 0,4 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$) als die fluorierte Verbindung ($K_M = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$) vom Enzym bevorzugt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Substrate bei Substratsättigung sind ebenfalls fast

identisch. Es ist interessant, daß die Stereoselektivität der Phosphomevalonatkinase bezüglich des fluorierten Produkts mit der Selektivität der Mevalonatkinase übereinstimmt.

Zur Identifizierung des Reaktionsproduktes wurde die 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure auch in präparativem Maßstab dargestellt: Die Inkubation von ^{32}P -Phospho-2-Fluormevalonsäure mit ATP und Phosphomevalonatkinase führt in Gegenwart von Phospho-enolpyruvat und Pyruvatkinase als ATP-regenerierendes System nahezu quantitativ zur ^{32}P -Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure. Durch Hochspannungs-papier-elektrophorese und anschließende präparative Papierchromatographie konnte die neue, radioaktive Verbindung in ca. 90% Ausbeute in reiner Form isoliert werden.

Sie verhielt sich bei der Papierelektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 6,2 genau wie die Pyrophosphomevalonsäure. Bei der Papierchromatographie in verschiedenen Fließmitteln wanderte sie etwas langsamer, also ganz in Analogie zu dem Paar Phosphomevalonsäure/Phospho-2-Fluormevalonsäure (vgl. Tabelle 9).

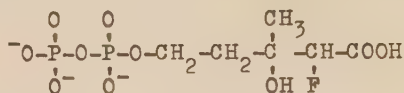
Tabelle 11

Hochspannungs-Papierelektrophorese und Papierchromatographie der 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure

Substanz	Hochspannungs- papierelektro- phorese pH 6,2 RPO_4	Papierchromatographie	
		Äthanol/ konz. NH_3 / H_2O (8:1:1) RPO_4	tert. Ämyl- alkohol/Eis- essig/ H_2O (4:1:2) ² RPO_4
5-Pyrophos- phomevalon- säure	1, 12	0,56	0,58
5-Pyrophospho- 2-Fluormevalon- säure	1, 12	0,52	0,52

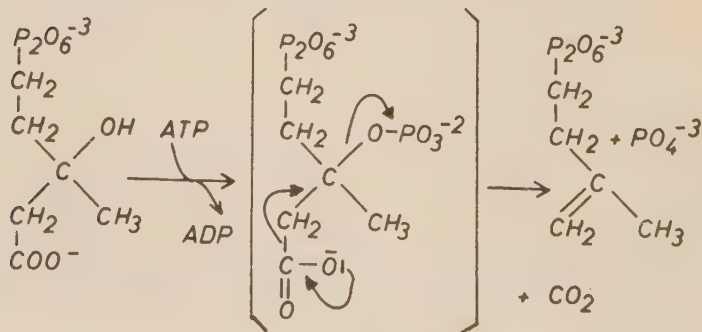
Bedingungen wie in Tabelle 9

Zur weiteren Sicherstellung der Konstitution der neuen Verbindung als 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure wurde eine Probe in 1 n HCl 7 Min. auf 100° erhitzt und anschließend papierchromatographisch untersucht. Dabei wurde quantitativ radioaktive 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure zurückgewonnen, die unter diesen Bedingungen stabil ist (vgl. S. 50). Unter gleichen Bedingungen wird Pyrophosphomevalonsäure ebenfalls quantitativ zu anorg. Phosphat und Phosphomevalonsäure gespalten. Damit ist die Identität des neuen, fluorierten Reaktionsproduktes als 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure ausreichend bewiesen.

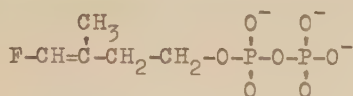


c) Die Hemmung der Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase durch 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure

Bei der Umwandlung von Pyrophosphomevalonsäure in Squalen wird als nächstes Zwischenprodukt Isopentenylpyrophosphat gefaßt³⁾. In diesem Reaktionsschritt wird die Pyrophosphomevalonsäure unter Eliminierung der β-Hydroxylgruppe dekarboxyliert, wobei gleichzeitig ATP in ADP und Orthophosphat gespalten wird^{28,29)}. Nach Bloch²⁹⁾ verläuft die Reaktion sehr wahrscheinlich über einen Mehrzentrenprozeß, in dem die Stufe eines Mevalonsäuretriphosphats als instabile Übergangsstufe durchlaufen wird:



Bei der Verfolgung der biologischen Umwandlungen der 2-Fluormevalonsäure stellt sich hier die Frage, ob auch ein fluoriertes Isopentenyl-pyrophosphat aus Pyrophospho-2-Fluor-mevalonsäure synthetisiert werden kann.



Diese Stufe ist insofern wichtig, als dabei zum ersten Mal das fluortragende Kohlenstoffatom unmittelbar in eine enzymatische Reaktion miteinbezogen wird. Wie beim Studium der ersten beiden Phosphokinase-Reaktionen wurde zuerst die Wirkung steigender Mengen der Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure auf die Dekarboxylierungs-Geschwindigkeit des natürlichen Substrats, der Pyrophosphomevalonsäure, untersucht.

2-¹⁴C-Pyrophosphomevalonsäure wurde zusammen mit ATP und einer gereinigten Proteinfraction aus Hefe inkubiert, die die Dekarboxylase enthält. Durch Zusatz gereinigter Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase wurde für die rasche Überführung des Reaktionsprodukts in säurelabile Terpenyl-pyrophosphate gesorgt. Die Abnahme des radioaktiven Substrats konnte deshalb durch Messung der Restradioaktivität verfolgt werden, die nach Spaltung des Dimethylallyl-pyrophosphats und seiner Folgeprodukte mit Trichloressigsäure und Extraktion mit Äther im wässrigen Rückstand verbleibt. Wie Tabelle 12 (siehe S.60) zeigt, wird die Dekarboxylierungs-Geschwindigkeit der Pyrophosphomevalonsäure durch Zusatz steigender Mengen Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure im Sinne einer kompetitiven Hemmung verringert.

In Analogie zu den Versuchen mit 2-Fluormevalonsäure und Phospho-2-Fluormevalonsäure konnte die Frage, ob es sich bei der Hemmwirkung des fluorierten Derivats um eine rein kompetitive Hemmung oder um die gleichzeitige Umwandlung der unnatürlichen Verbindung in ein fluoriertes Isopentenyl-pyrophosphat handelt, durch Einsatz der Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure im optischen Test für die Dekarboxy-

Tabelle 12

Die Hemmwirkung der Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure auf die Umwandlung von Pyrophosphomevalonat

Pyrophospho-2- ^{muM} Fluor- mevalonsäure zugesetzt	^{IpM} 2- ¹⁴ C-Pyrophospho- mevalonsäure umgesetzt
---	721
1,0	571
2,0	534
4,0	415
8,0	273
16,0	118

Ansätze: 20 μ M Tris/HCl-puffer pH 8,0; 6 μ M $MgCl_2$; 6 μ M K_2 -Mg-ÄDTA; 1 μ M ATP; 2 μ M K_2 -Phospho-enol-2-pyruvat; Phosphomevalonatkinase (0,16 mg); Pyrophosphomevalonat-dekarboxylase (0,4 mg Protein); Pyruvatkinase (10 μ g Protein); Vol 0,6 ml. Start mit je 3,4 μ M K_2 -2-¹⁴C-Pyrophosphomevalonat (1140 IpM) und K_3 -Pyrophospho-2-Fluormevalonat wie in der Tabelle. Inkubation: 4 Min. bei 37°. Stop, Aufarbeitung und Auszählung wie in Tabelle 10, S.54

lase (D) beantwortet werden. Dieser Test läuft ebenfalls auf die Bestimmung des im Laufe der Reaktion stöchiometrisch gebildete ADP hinaus und bedient sich deshalb desselben Hilfssystems wie im optischen Test für die beiden Phosphokinasen: Sinngemäß wird hier die Pyrophosphomevalonsäure als ATP-verbrauchendes Substrat eingesetzt.

1. Pyrophosphomevalonat + ATP $\xrightarrow{D}$ Isopentenylpyrophosphat + CO_2 + ADP + PO_4^{-3}
2. Phospho-enolpyruvat + ADP $\xrightarrow{PK}$ Pyruvat + ATP
3. Pyruvat + DPNH $\xrightarrow{MDH}$ Lactat + DPN

Pyrophosphomevalonat + Phospho-enolpyruvat + DPNH $\xrightarrow{D, PK, MDH}$ Isopentenyl-pyrophosphat + CO_2 + Lactat + PO_4^{-3} + DPN

Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb.17 wieder-
gegeben:

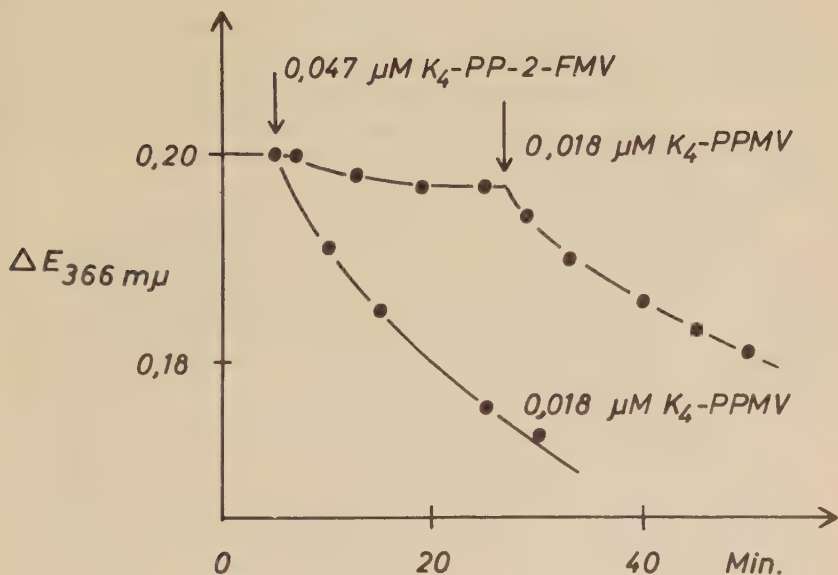


Abb.17: Das Versagen der enzymatischen Dekarboxy-
lierung der Pyrophospho-2-Fluor-mevalon-
säure

Ansätze und Bedingungen des optischen Tests
wie in Abb.13.

Änderungen: 5 μM ATP; Zusatz von 10 μg Myo-
kinase; 0,5 mg Pyrophosphomevalonat-Dekarbo-
xylase. Start mit 0,047 μM $\text{K}_4\text{-2-Fluor-pyro-}$
phosphomevalonat (O---O) mit 0,018 μM $\text{K}_4\text{-}$
Pyrophosphomevalonat (O---C) bzw. ($\downarrow$).
Messung gegen Blindküvette ohne Substrate

Ganz klar geht daraus hervor, daß in diesem Schritt die
Spezifität des Enzyms so absolut ist, daß die Einführung
des Fluorsubstituenten eine Weiterreaktion verbietet.
Setzt man dem Ansatz mit der fluorierten Verbindung nach-
träglich etwas Pyrophosphomevalonsäure zu, so wird diese

etwas langsamer umgesetzt als ohne Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure. Dies stimmt mit der vorher beobachteten kompetitiven Hemmwirkung durch das fluoriierte Derivat überein.

Bei der präparativen Inkubation von ^{32}P -markierter Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure mit ATP und der Dekarboxylase wurde das Ergebnis des optischen Tests bestätigt. Das fluoriierte Derivat wurde von diesem Enzym nicht weiter umgewandelt, denn im Papierchromatogramm ließ sich nur das unveränderte Ausgangsmaterial nachweisen.

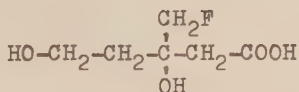
Daraus ergibt sich, daß die Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure wohl noch an das aktive Zentrum des Enzyms angelagert wird und auf diese Weise das natürliche Substrat verdrängen kann, daß die Nähe des Fluorsubstituenten zur β -OH-Gruppe jedoch die Phosphorylierung verbietet, die die Dekarboxylierung einleitet.

Die Hemmwirkung der 2-Fluormevalonsäure auf die Squalensynthese aus Mevalonsäure erstreckt sich also auf drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte. Dies wird durch die Besonderheit bedingt, daß die 2-Fluormevalonsäure in den ersten beiden Schritten in den Phosphor- und Pyrophosphorsäure-ester umgewandelt wird. Allerdings scheiden 75%, entsprechend 3 Diastereomeren der 2-Fluormevalonsäure, wegen der Stereospezifität der Mevalonatkinase aus. Die für das Enzym entscheidende Veränderung, die die Mevalonsäure durch Einführung eines Fluorsubstituenten am Kohlenstoffatom C_2 erfährt, betrifft nur die stereospezifischen Voraussetzungen für die Enzym-Substrat-Bindung: Die anschließende Phosphorylierung mit ATP verläuft fast ebenso rasch wie mit dem natürlichen Substrat. Es ist interessant, daß die stereospezifische Auswahl durch die Mevalonatkinase zu einer Phospho-2-Fluormevalonsäure führt, die von der Phosphomevalonatkinase ohne Weiteres in den Pyrophosphorsäureester überführt wird. Dies läßt auf eine ähnliche Struktur der aktiven Zentren beider Enzyme schließen. Die Leichtigkeit, mit der das "richtige" Diastereomere

der 2-Fluormevalonsäure in den Phosphor- und Pyrophosphorsäure-ester umgewandelt wird, ist wahrscheinlich auf die Entfernung des Fluorsubstituenten von der 5-OH-Gruppe, dem eigentlichen Reaktionsort, zurückzuführen. Die komplementäre Forderung, daß Reaktionen in unmittelbarer Nähe des Fluorsubstituenten erschwert sein müßten, findet im Versagen der Dekarboxylierung der Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure ihre Bestätigung.

Die Addition der in drei Reaktionsschritten erfolgenden kompetitiven Hemmung ergibt die im Vorversuch gemessene in-vitro-Hemmung der Squalensynthese aus Mevaldinsäure von 86% (vgl. S. 44). In vivo liegen kompliziertere Verhältnisse vor: einerseits könnte die 2-Fluormevalonsäure auch eine unspezifische Hemmwirkung auf die Synthesekette von Acetat zur Mevalonsäure entfalten. Andererseits wird es in der Zelle zur Anhäufung von Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure kommen, deren reversible Hemmwirkung jedoch durch ein genügend großes Angebot an natürlichem Substrat oder durch Abbau überwunden werden könnte. Es muß jedoch weiteren Versuchen vorbehalten werden, die Hemmwirkung der 2-Fluormevalonsäure in vivo zu untersuchen.

Feststeht auch weiterhin, daß der von Langdon beobachtete Einbau von Fluoracetat in die Fraktion der unverseifbaren Lipide⁴³⁾ nicht über die Stufe der 2-Fluormevalonsäure laufen kann. Das einzige Isomere der 2-Fluormevalonsäure, dessen Fluorsubstituent an einem Kohlenstoffatom sitzt, das nie unmittelbar in das Reaktionsgeschehen mitbezogen wird --- und deshalb die größten Chancen für den Einbau in fluorierte Poly-isoprenoide aufweist --- ist die in der angulären Methylgruppe fluorierte Mevalonsäure:

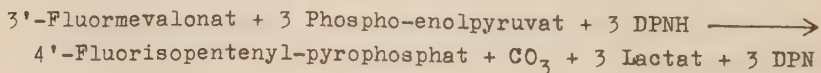
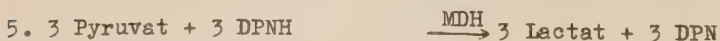
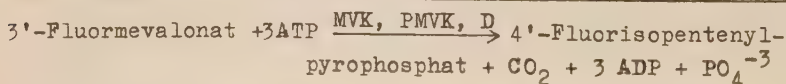
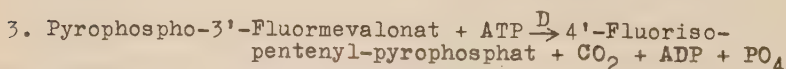
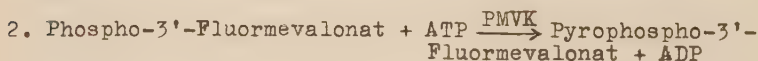
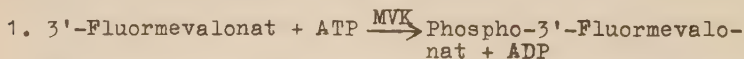


Nachdem es nicht gelungen war, die 2-Fluormevalonsäure in fluorierte Terpene einzubauen, erschien das Verhalten dieser zweiten Fluormevalonsäure besonders interessant.

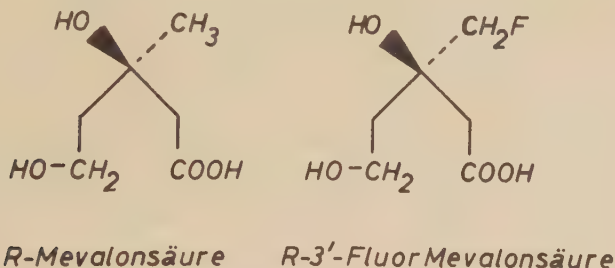
2. Die Biosynthese von 5-Pyrophospho-3'-Fluor-mevalonsäure

a) Stöchiometrie

Herr Dr. H. Machleidt (Universität Hamburg) war so freundlich, uns 10 mg des krist. Dibenzyl-äthylen-diammoniumsalzes der D,L-3'-Fluormevalonsäure (Schmp. 105-106°) zu überlassen. So war es möglich, die bei der Fluormevalonsäure geschilderte Untersuchungen auch an diesem Isomeren durchzuführen. Um mit der begrenzten Menge des Antimetaboliten möglichst viele Fragen auf einmal beantworten zu können, wurde die Stöchiometrie der möglichen Umwandlung in 4'-Fluor-Isopentenyl-pyrophosphat mit Hilfe des kombinierten optischen Tests untersucht: Da bei der Synthese des Isopentenyl-pyrophosphats aus Mevalonsäure in drei aufeinanderfolgenden, ATP-verbrauchenden Schritten jedesmal die stöchiometrische Menge ADP entsteht, kann man aus dem insgesamt gemessenen ATP-Verbrauch abschätzen, wieviele Reaktionsschritte in der Synthesekette von der Mevalonsäure zum Isopentenyl-pyrophosphat von der 3'-Fluormevalonsäure durchlaufen werden können:



Im Falle der 3'-Fluormevalonsäure entsteht durch die Einführung des Fluorsubstituenten in die anguläre Methylgruppe kein zusätzliches Asymmetriezentrum. Wie im Falle der synthetischen D,L-Mevalonsäure wäre auch hier zu erwarten, daß, wenn überhaupt, dann nur das der natürlichen Mevalonsäure entsprechende Enantiomere im ersten Reaktionsschritt phosphoryliert werden kann:



Wie man aus Abb.18 (siehe S.66) ersieht, werden bei der der Inkubation von 3'-Fluormevalonsäure mit überschüssigem ATP und Mevalonatkinase (MVK) tatsächlich nur 0,5 Mol ATP verbraucht. Die erneute Bildung von ADP, die nach dem Abklingen der ersten Phosphokinase-Reaktion durch Zusatz von Phosphomevalonatkinase (PMVK) eingeleitet wird, beweist, daß die Phospho-3'-Fluormevalonsäure auch in den Pyrophosphorsäure-ester umgewandelt werden kann (Kurve A).

Aus dem Vergleich des ATP-Verbrauchs bei der Inkubation der 3'-Fluormevalonsäure mit Mevalonatkinase einerseits (1 Äq.ATP), und mit Mevalonatkinase, Phosphomevalonatkinase und Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase (D) andererseits (Soll = 3 Äq.ATP), zeigt sich klar, daß die Umwandlung der 3'-Fluormevalonsäure nach dem Verbrauch von nur 2 Äquivalenten ATP (Kurve B), d.h. auf der Stufe der Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure, stehen bleibt. Die Aktivität der Dekarboxylase wird durch den raschen Abfall der Extinktion nach Zugabe des natürlichen Substrats, der Pyrophosphomevalonsäure, bewiesen. Außerdem sieht man, daß die

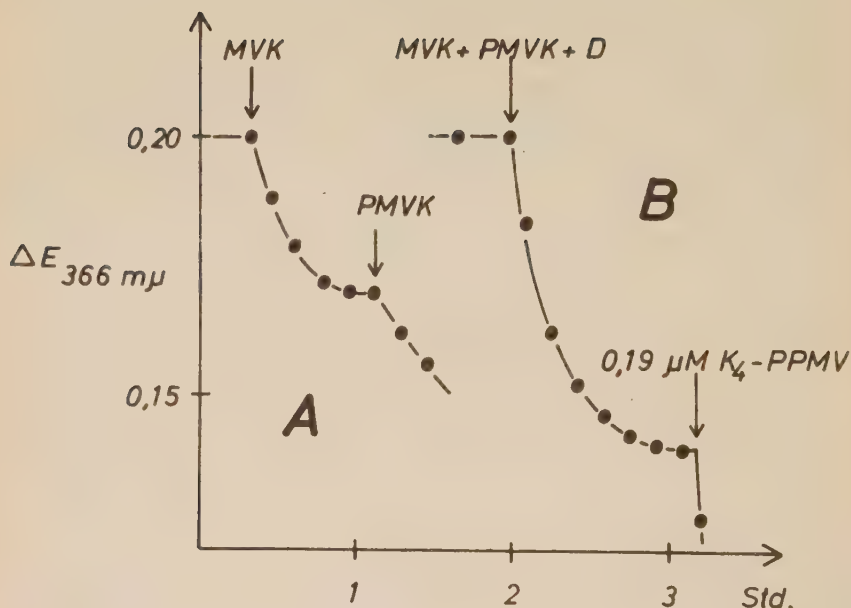


Abb.18: Die Stöchiometrie der Pyrophosphorylierung der 3'-Fluormevalonsäure

Ansätze und Bedingungen wie in Abb.17.

A = 0,032 μM K-3'-Fluormevalonat.

Start mit Mevalonatkinase (0,44 mg Protein); die Extinktionsabnahme entspricht 0,015 μM DPNH. Beim 2. Pfeil Zusatz von Phosphomevalonatkinase (0,29 mg Protein).

B = 0,032 μM K-3'-Fluormevalonat; Start mit Mevalonatkinase (0,44 mg Protein), Phosphomevalonatkinase (0,29 mg Protein) und Pyrophosphomevalonatdekarboxylase (0,31 mg) zusammen. Beim 2. Pfeil Zusatz von 0,19 μM $\text{K}_4\text{-Pyrophosphomevalonat}$. Die Extinktionsabnahme entspricht 0,033 μM DPNH

Hemmwirkung der Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure auf die Dekarboxylierungs-Reaktion höchstensfalls kompetitiv sein kann.

b) Die Identifizierung von 5-Phospho- und 5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure

Um die summarischen Ergebnisse des optischen Tests zu erhärten, wurden die mit ^{32}P -markierten Verbindungen durch Inkubation von 3'-Fluormevalonsäure, AT^{32}P und den entsprechenden Enzymen in mikropräparativem Maßstab dargestellt, und papierelektrophoretisch sowie papierchromatographisch mit den entsprechenden Derivaten der Mevalonsäure und der 2-Fluormevalonsäure verglichen.

Bei der Inkubation der 3'-Fluormevalonsäure mit AT^{32}P und Mevalonatkinase wurde nach der papierelektrophoretischen und papierchromatographischen Reinigung in 76 proz. Ausbeute die ^{32}P -5-Phospho-3'-Fluormevalonsäure erhalten. Die gereinigte Verbindung wurde anschließend in einem zweiten Ansatz mit ATP und Phosphomevalonatkinase inkubiert. Um die Reaktion ganz auf die Seite der Synthese zu verschieben, wurde das gebildete ADP durch Zusatz von Phospho-enolpyruvat und Pyruvatkinase wieder zu ATP phosphoryliert. Nach entsprechender Reinigung fiel die ^{32}P -5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure in 80 proz. Ausbeute an. Das Verhalten der beiden Verbindungen bei der Hochspannungspapierelektrophorese und der Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln ist in Tabelle 13 (siehe S. 68) wiedergegeben.

Wie aus dem Vergleich mit den R_f - und R_{PO_4} -Werten der entsprechenden Derivate der Mevalonsäure⁴ und der 2-Fluormevalonsäure hervorgeht, besteht eine weitgehende Übereinstimmung der Eigenschaften mit den Mevalonsäurederivaten. Dies läßt sich dadurch erklären, daß der Fluor-substituent in der elektronisch starren Methylgruppe einen viel geringeren modifizierenden Einfluß ausüben kann als die 2-Fluor-Gruppe.

Bei der Inkubation der ^{32}P -5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure mit der Dekarboxylase und ATP in präparativem Maßstab, konnte bei der anschließenden papierchromatographischen Analyse kein neues Reaktionsprodukt, sondern nur unverändertes Ausgangsmaterial gefunden werden.

Tabelle 13

Hochspannungs-Papierelektrophorese und Papierchromatographie der 5-Phospho- und 5-Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure

Substanz	Hochspannungs- papierelektro- phorese Pyridin-Acetat- puffer pH 6,2 R_{PO_4}	Papierchromatographie	
		Methanol/ konz.NH ₃ / Wasser (6:1:3) R_f	tert.Amyl- alkohol/Eis- essig/Wasser (4:1:2) R_{PO_4}
5-Phospho- mevalonsäure	1,12	0,56	1,47
5-Phospho-2- Fluormevalon- säure	1,12	0,52	0,96
5-Phospho-3'- Fluormevalon- säure	1,12	0,56	1,06
5-Pyrophospho- mevalonsäure	1,12	---	0,58
5-Pyrophospho- 2-Fluormevalon- säure	1,12	---	0,52
5-Pyrophospho- 3'-Fluormevalon- säure	1,12	---	0,61

Bedingungen wie in Tabelle 9

Damit war auch der Beweis geliefert, daß das Schicksal der 3'-Fluormevalonsäure in der Hefe dem der 2-Fluormevalonsäure genau entspricht. Auch hier wurde die Hoffnung enttäuscht, ein fluoriertes Isopentenyl-pyrophosphat zu erhalten. Die dadurch aufgezeigte strenge Selektivität der Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase, die auch auf Veränderungen der angulären Methylgruppe anspricht, macht es unwahrscheinlich, daß die letzte, noch ungeprüfte Fluormevalonsäure, die 4-Fluor-Verbindung³²⁾, diese Hürde überspringen kann. Damit ist der Einbau von Fluoracetat

in die Terpene auf dem Wege, den das Acetat in der Zelle beschreitet, in Frage gestellt. Andererseits ist die Natur der fluorierten, unverseifbaren Lipide als "fluorierte Analoga von Squalenvorläufern"⁴³⁾ "durch keinerlei Beweise gesichert, so daß die Klärung des Problems zuerst an dieser Stelle einsetzen müßte, bevor die Untersuchung mit anderen, fluorierten Mevalonsäuren angezeigt ist.

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge 3'-Fluormevalonsäure konnte kein Versuch über das Ausmaß der Hemmwirkung der Verbindung auf die Squalensynthese aus Mevalonsäure gemacht werden. Es ist interessant, daß die von Singer et.al.⁷⁷⁾ mit derselben Verbindung ausgeführten Hemmversuche auf die Cholesterinsynthese in Rattenleberhomogenaten eine starke Hemmwirkung ergaben, die sich aber je nach Ausgangsmaterial unterschied: Die Cholesterinsynthese aus Acetat wird dabei 5-10mal stärker gehemmt als die Synthese aus Mevalonsäure. Zusätzlich zu der kompetitiven Hemmung der Verbindung auf die Squalensynthese aus Mevalonsäure, die wahrscheinlich ebenso groß ist wie im Falle der 2-Fluormevalonsäure, entfaltet die 3'-Fluormevalonsäure also eine unspezifische Hemmwirkung auf die Biosynthese der Mevalonsäure aus Acetat

C. Beschreibung der Versuche

I. Reinigung und Eigenschaften der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

1. Die Synthese von Farnesyl-pyrophosphat

Mikroanalysen wurden von Herrn H. Schulz, Institut für organische Chemie, Universität München, ausgeführt.

Zur Phosphatbestimmung, die als hauptsächliches analytisches Werkzeug bei der Ausarbeitung der Synthese diente, wurde eine Modifikation der Methode von King⁷⁸⁾ verwendet:

Anorganisches Phosphat: Die Probe ($0,03 - 0,3 \mu\text{M PO}_4$) wird in einem auf 2,5 ml geeichten 10 ml Reagensglas mit H_2O zu 1,0 ml verdünnt, mit 0,1 ml 70% (11,6 n) HClO_4 p.A., und 0,1 ml 5 proz. Ammonium-Molybdat-Lösung p.a. versetzt. Die Farbentwicklung wird durch Zusatz von 0,1 ml einer frischbereiteten Lösung von 250 mg "Eiconogen" (1 Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure) 500 mg $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 14 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 100 ml H_2O eingeleitet. Nach 10 Min. wird die Extinktion bei 720 m μ (Zeiss-Spektralphotometer) und $d = 2,0 \text{ cm}$ gegen eine Blindprobe gemessen.

$$\Delta E / 0,1 \mu\text{M PO}_4 = 0,320$$

Labiles ("7-Min.") Phosphat:

Die Probe wird auf 1,0 ml mit H_2O aufgefüllt, mit 0,10 ml 70% HClO_4 versetzt (Endkonz. 0,96 n) und 7 Min. bei 100° gehalten. Nach dem Abkühlen erfolgt die Bestimmung wie bei anorganischem Phosphat.

Organisches Phosphat: Die Probe wird mit 0,1 ml 70% HClO_4 vorsichtig verascht, bis die Lösung wieder farblos wird (2-4 Min.). Nach dem Abkühlen wird 1,0 ml H_2O zugege-

ben und anorganisches Phosphat bestimmt.

Allyl-Phosphat: Die Probe wird auf 1,0 ml H_2O verdünnt, mit 0,1 $HClO_4$ versetzt und 15 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird anorganisches Phosphat bestimmt. Zur Bestimmung von gleichzeitig anwesendem anorganischen Phosphat wurde die Methode von H. Eggerer⁴⁵⁾ verwendet, bei der durch Bromaddition an das störende Farnesyl-phosphat die säurelabile Phosphorsäure-esterbindung in eine säurestabile Form überführt wird.

Allyl-pyrophosphat: Wird wie anorganisches Pyrophosphat als Differenz zwischen "7-Minuten-Phosphat" und "Allyl-phosphat" gemessen.

Hexabromfarnesol

Zur Bromierung wird eine Bromlösung in Chloroform nach folgender Vorschrift frisch hergestellt. 2,62 ml (7,68 g = 48 mM) gereinigtes Brom (mit gleichem Volumen konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt und destilliert werden in 20 ml absolutem Chloroform (über P_2O_5 destilliert) und über Aluminiumoxyd Woelm, basisch, Akt. Stufe I, filtriert) gelöst. Zur Gehaltsbestimmung wird 0,1 ml der Lösung mit 10 ml H_2O und 1,0 ml frischer, 20 proz. KJ-Lösung versetzt, und das ausgeschiedene Jod mit n/10 Thiosulfat gegen Stärke titriert. (Gehalt ca. 4,3 m At Br/ml)

888 mg (4 mM) destilliertes Farnesol (Sdp. 0,2 mm = 108-109°) werden in 5 ml abs. Chloroform gelöst und unter magnetischem Rühren mit Hilfe eines Aceton/Kohlensäurebades auf -20° (Außentemperatur) gekühlt. Aus einem mit P_2O_5 vor Feuchtigkeit geschütztem Tropftrichter wird die stöchiometrische Menge Bromlösung (= 24 m At. Br, ca. 6 ml) innerhalb von 10 Min. zugetropft. Nach Zugabe des Broms wird die orange gefärbte Lösung noch 5 Min. bei -20° weitergerührt. Dann wird das Lösungsmittel zusammen mit geringen Mengen Bromwasserstoffs und überschüssigen Broms bei 40° im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird 2 mal hintereinander in je 10 ml abs. Äther aufgenommen und der Äther

im Vakuum wieder entfernt. Zuletzt wird bei 0,5 mm getrocknet.

Ausbeute: 2,73 g (96% d.Th.) eines weingelb gefärbten Harzes, das sich beim Stehen am Licht nach schwarz verfärbt.

Hexabromfarnesol: $C_{15}H_{26}OBr_6$ (702,7)

Das Reaktionsprodukt wurde nicht weiter gereinigt, sondern sofort weiterverarbeitet.

Hexabromfarnesyl-phosphat

2,81 g (4 mM) Hexabromfarnesol werden in 4 ml abs. Chloroform gelöst, mit 2,5 ml (1,83 g, 18 mM) abs. Triäthylamin (2 mal über Ätzkali destilliert) versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluß mittels eines Aceton/Kohlensäurebades auf -78° gekühlt. Aus einem mit P_2O_5 -Röhrchen geschützten Tropftrichter wird eine Lösung von 1,1 ml (1,84 g; 12 mM) frisch destilliertem $POCl_3$ in 2 ml abs. Chloroform innerhalb von 20 Min. unter magnetischem Rühren zugetropft. Anschließend wird noch 10 Min. bei -78° und, nach Entfernung des Kühlbades, 5 Std. bei Zimmertemperatur weitergerührt. Unter Abscheidung eines weißen, kristallinen Niederschlags verfärbt sich die Lösung allmählich nach braun. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch in einem Scheidetrichter auf 20 g zerstoßenes Eis getropft. Unter Eiskühlung wird die Lösung vorsichtig mit 5 m KOH auf pH 8-9 gebracht (Phenolphthalein) und das ausgeschiedene Triäthylamin mit 60 ml Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung wird wieder mit 5 m KOH auf pH 8-9 nachgestellt, mit 60 ml Äther extrahiert und der Vorgang noch 2mal wiederholt, bis das pH konstant bei 8-9 bleibt (ca. 13 ml 5 m KOH).

Die vereinigten Ätherextrakte werden 2mal mit je 10 ml 0,1 n KOH zurückextrahiert. (Vol. d. Äthers 243 ml, 0,3 mM Gesamtphosphat). Die alkalische, braungefärbte, wäßrige Lösung wird nun bei 0° vorsichtig mit ca. 2-3 ml 10 n HCl angesäuert und die ausgeschiedene Säure 3 mal mit je 30 ml Essigester ausgezogen. Zuletzt wird mit NH_4Cl

gesättigt und noch einmal nachextrahiert. Die organische Phase wird nach dreimaligem Waschen mit je 5 ml Wasser über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum auf ca. 60 ml eingeengt (Vol. = 63 ml; 3,6 mM Gesamtposphat). Nach Zusatz von 0,97 ml (0,79 g, 8 mM) Cyklohexylamin wird die Lösung durch Zusatz von ca. 2 ml H₂O gesättigt und über Nacht bei -15° gehalten.

Das amorph ausgefallene Di-cyklohexylammoniumsalz der Hexabromfarnesyl-phosphorsäure wird abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Austrag: 2,1 g (53% d.Th.) beigefarbenes Rohprodukt
Schmp. 92-97° (unscharf, Zers.)

Die Mutterlauge enthält noch viel organisches Phosphat. Bei der Aufarbeitung erhält man jedoch nur schlecht kristallisierende, braune Öle.

Zur Umkristallisation wird das Rohprodukt in 100 ml Essigester gelöst, mit 2 Tropfen Cyklohexylamin versetzt und die Lösung mit Wasser (3 ml) gesättigt. Beim Abkühlen auf -15° kristallisiert das analysenreine Di-cyklohexylammonium-hexabromfarnesyl-phosphat in Form von feinen, farblosen Nadelchen.

Ausbeute: 1,2 g (31% d.Th.) Schmp. 97-99°



Ber. C 33,08 H 5,45 N 2,86 P 3,16

Gef. C 33,25 H 5,63 N 2,74 P 3,17

Das Salz ist löslich in Alkohol, Aceton, Essigester, Äther und Benzol, unlöslich in Wasser und Petroläther.

In methanolischer Lösung fällt bei Zusatz von methanolischem AgNO₃ momentan AgBr aus.

Zur weiteren Verarbeitung wird das Rohprodukt ohne nochmalige Umkristallisation eingesetzt.

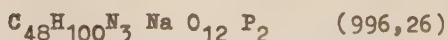
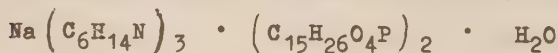
Farnesyl-phosphat

1,97 g (2 mM) rohes Di-cyklohexylammonium-hexabromfarnesyl-phosphat (Schmp. 92-97°) werden in einem 100 ml Zentrifugenglas in 30 ml Methanol gelöst. Unter Durchmischung mit einem Vibromixer (Sartorius-Werke, Göttingen) und unter

gleichzeitigem Einleiten von CO_2 durch den hohlen Stiel des Mischers werden 65 g (60 mM Na) frisch bereitetes 2 proz. Na-Amalgam in 5 Portionen zu je 13 g eingetragen. Die Mischplatte wird dabei so eingestellt, daß die flüssige Amalgamschicht so weitgehend wie möglich zerschlagen wird. Während der Reaktion erwärmt sich das Reaktionsgemisch auf ca 35° . Allmählich scheidet sich ein weißer, schleimiger Niederschlag aus, der jedoch nicht stört. Nach Beendigung der H_2 -entwicklung (ca. 5 Min. pro Portion) ist die reduktive Entbromierung beendet.

Die Suspension wird vom Quecksilber abdekantiert, der Niederschlag abzentrifugiert und anschließend 3 mal gründlich mit je 10 ml Methanol durchgerieben und wieder zentrifugiert. Die vereinigten Überstände, die 97% des Gesamtphosphats als labiles "Allyl-phosphat" enthalten, werden dann im Vakuum bis zur Trockne eingeengt (Wasserbad maximal 40°). Der weiße Rückstand (7,4 g), der viel NaBr und NaHCO_3 enthält, wird in heißem Wasser aufgenommen (unlösliche Flocken werden mitgespült), mit 0,25 ml (0,25 g, 2,5 mM) Cyklohexylamin versetzt und über Nacht bei 0° aufbewahrt. Der amorphe Niederschlag wird abzentrifugiert, und der Überstand (86 μM Phosphat = 4%) verworfen. Zur Entfernung von restlichem NaBr und NaHCO_3 wird der Rückstand in 25 ml Wasser bei 60° gelöst und mit 2 Tropfen Cyklohexylamin auf pH 9-10 gebracht. Beim langsamen Abkühlen auf 0° kristallisiert das Natrium-cyklohexylammoniumsalz der Farnesylphosphorsäure in Form von feinen Nadeln. Die Kristalle werden im Kühlraum abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und durch Durchsaugen von Luft getrocknet.

Ausbeute: 754 mg (1,51 mM, 75% d.Th.) Schmp. $134-139^\circ$



Ber. N 4,22 P 6,22

Gef. N 4,16; 3,98 P 6,24; 6,18

Die Mutterlauge enthält 0,45 mM (22%) Allyl-phosphat und

kann durch Zusatz von Aceton nochmals zur Kristallisation gebracht werden.

Das Salz ist leicht löslich in Methanol. In der Kälte wenig löslich in Wasser, Alkohol, Essigester, Aceton, Äther, Benzol, unlöslich in Petroläther. Die wäßrige Lösung hat ein pH von 9-10. Das Salz benimmt sich wie eine Seife, so daß wäßrige Lösungen wegen starker Schaumbildung nicht im Vakuum eingeeengt werden können (Gefriertrocknung!)

Die Anwesenheit von Natrium wurde durch die Bildung der charakteristischen Oktaeder ($\text{NaMg}(\text{UO}_2)_3(\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) mit Mg-Uranylacetat nachgewiesen. Farnesyl-phosphat ist außerordentlich säurelabil. Nach 15 Min. in 1 n Säure bei 25° ist die Spaltung zu anorganischem Phosphat vollständig.

Analyse der organischen Spaltprodukte

Phosphatatische Spaltung:

2 mg Natrium-cyklohexylammonium-farnesyl-phosphat wurden in 2 ml 0,1 ml K-Acetatpuffer pH 5,6 gelöst, mit gereinigter Prostata-Phosphatase (1,98 mg Protein) versetzt und 3 Std. bei 37° inkubiert. Durch Zusatz von 1 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol und 1,3 ml Methanol (Endkonz. 50 proz. Methanol) wurde das Reaktionsgemisch 6 mal mit je 3 ml Petroläther ($50-70^\circ$) extrahiert; die vereinigten Petrolätherextrakte wurden nach der Wäsche mit 2 ml Wasser eingeeengt, der ölige Rückstand in 0,1 ml Aceton aufgenommen und papierchromatographisch analysiert.

Als analytisches Verfahren wurde die Phasenumkehrpapierchromatographie von Kaufmann und Nitsch⁵⁷⁾ für die Papierchromatographie der Polyterpen-alkohole verwendet: Schleicher & Schüll-Papier 2040 b wird in Streifen 28 x 56 cm geschnitten. Jeder Streifen wird in einem Zug durch eine 10 proz. Lösung von Paraffinöl (Sdp. $200-220^\circ$) in peroxydfreiem Äther gezogen und kurz bei 50° getrocknet. Von dem abgetropften Ende wird ein Streifen von 2 cm abgeschnitten. Die Substanzen werden als 2 proz. Lösungen in Aceton aufgetragen (Beladung = 10-200 μg). Nach dem Auftragen wird das Chromatogramm 15 Min. äquilibriert

und dann mit 80 proz. Aceton/Wasser (mit Paraffinöl gesättigt) 3 Std. aufsteigend entwickelt. Durch Veränderung der Acetonkonzentration kann auch eine noch bessere Trennung in entweder der Gruppe der rasch wandernden Verbindungen (Erniedrigung der Acetonkonzentration) oder in der Klasse der lipophileren, langsamer wandernden Terpenalkohole (Erhöhung der Acetonkonzentration) erzielt werden. Die ungesättigten Substanzen werden durch Besprühen mit 0,1 proz. KMnO_4 als gelbe Flecken auf rosa Hintergrund sichtbar gemacht. In Tab.4, S.31 sind R_f -Werte der interessierenden Verbindungen aufgeführt.

Bei der Analyse des phosphatatischen Spaltungsproduktes war nach dem Besprühen mit 0,1 proz. KMnO_4 nur Farnesol (R_f 0,93) nachzuweisen.

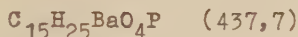
Säurespaltung:

Je 2 mg Natrium-cyklohexylammonium-farnesyl-phosphat wurden in je 1,0 ml Wasser, 50 proz. Methanol und reinem Methanol gelöst, und mit je 0,1 ml 70 proz. HClO_4 versetzt. Nach 5 Min. bei 50° wurde abgekühlt, die Proben zu 2 ml 50 proz. Methanol ergänzt und wie oben beschrieben mit Petroläther extrahiert, mit 2 ml 0,5 n KOH gewaschen und chromatographiert. Nach dem Besprühen mit KMnO_4 -Lösung wurden folgende ungesättigte Verbindungen identifiziert:

Substanz	R_f	Lösungsmittel		
		Wasser	50 proz. Methanol	Methanol
Farnesol	0,93	+	+	-
Nerolidol	0,87	+	+	-
Farnesyl-methyl-äther	0,59	-	+	+
Nerolidyl-methyl-äther	0,42	-	+	+

Barium-farnesyl-phosphat:

100 mg (0,1 mM) Natrium-cyklohexylammonium-farnesyl-phosphat wurden in 3 ml H_2O warm (60°) gelöst und in der Wärme mit 0,1 ml (0,26 mM) 50 proz. Ba-Acetatlösung (pH 8,0) versetzt und mit 3 Tropfen 2n NH_3 auf pH 9 gebracht. Das unlösliche, amorphe Ba-salz wurde abzentrifugiert, 2 mal mit je 2 ml warmem (40°) Wasser und anschließend mit je 4 ml Alkohol und Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum über P_2O_5 betrug die Ausbeute 83 mg (0,19 mM, 95% d.Th.)



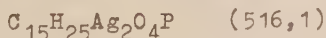
Ber.: P 7,08

Gef.: P 7,10

Silber-farnesyl-phosphat:

1,01 g (1 mM) Natrium-cyklohexylammonium-farnesyl-phosphat werden bei 50° in 20 ml H_2O gelöst und im Dunkeln tropfenweise mit 3 ml 5 m $AgNO_3$ versetzt. Durch tropfenweise Zugabe von 2n NH_3 wird das pH auf 9 eingestellt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, einmal mit 10 ml H_2O gewaschen, in 10 ml H_2O suspendiert und durch tropfenweise Zugabe von ca. 1,6 ml konz. NH_3 gelöst. Der feine, schwarze Rückstand (Ag) wird hochtourig abzentrifugiert und der klare Überstand mit 0,2 ml 5 n $AgNO_3$ versetzt. Durch tropfenweisen Zusatz von ca. 2 ml 2 m Essigsäure wird das pH auf 9,0 zurückgebracht. Nach dem Ankratzen beginnt die Kristallisation, die bei 0° vervollständigt wird. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, hintereinander mit je 5 ml 50 proz. Äthanol, 96 proz. Äthanol und Aceton gewaschen und unter Lichtausschluß im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 930 mg (1,8 mM 90% d.Th.)



Ammonium-farnesyl-phosphat:

516 mg (1 mM) Ag_2 -Farnesyl-phosphat werden in einem Zentrifugenglas in 1,5 ml H_2O aufgeschlämmt und mit einer

Lösung von 118 mg NH_4Cl in 1,0 ml H_2O gründlich digeriert. Dann wird vom ausgeschiedenen AgCl abzentrifugiert, der Niederschlag noch dreimal mit je 0,3 ml H_2O gewaschen und die Überstände vereinigt.

Vol. = 3,2 ml; Allyl-phosphat = 0,95 mM = (95% d.Th.)

Die Lösung wird direkt zur Synthese des Amidats eingesetzt.

Farnesyl-phosphorsäureamid:

Die Lösung des Ammonium-Farnesyl-phosphats wird in eine 250 ml Druckflasche pipettiert, mit 1 ml H_2O nachgespült und mit 0,37 ml (5 mM) konz. NH_3 versetzt. Nach Zusatz einer Lösung von 1,03 g (5 mM) Di-cyklohexyl-carbodiimid in 10 ml tert. Butanol wird das Reaktionsgemisch 10 Std. bei 80° unter Druckverschluß inkubiert. Beim Abkühlen beginnt bereits die Kristallisation des Cyklohexylharnstoffs, die durch Zugabe von 5 ml H_2O und Eiskühlung nach 1 Std. vervollständigt ist.

Dann wird von den Kristallen abgesaugt, Kolben und Kristalle 3 mal mit je 2 ml eines eiskalten Gemisches von tert. Butanol/ H_2O /konz. NH_3 (3:2:1) und zuletzt mit 3 ml H_2O gewaschen. Das gelbliche Filtrat wird im Vakuum bei einer Badtemperatur von 35° bis fast zur Trockne eingengt und in 20 ml abs. Äthanol aufgenommen.

Zur Analyse des Rohproduktes werden 0,005 ml der Lösung neben Farnesyl-phosphat als Vergleichssubstanz auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) aufgetragen und 4 Std. in n-Propanol/konz. $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (8:1:1) aufsteigend chromatographiert. Die Entwicklung der Flecken geschieht durch Besprühen mit 0,1 proz. KMnO_4 -Lösung oder dem Molybdat/Perchlorsäurereagens von Hanes und Isherwood⁷⁹⁾. Gewöhnlich verläuft die Amidierung quantitativ, so daß papierchromatographisch neben Farnesyl-phosphoamidat (R_f 0,80) kein Farnesyl-phosphat (R_f 0,45) nachgewiesen werden kann. Ferner gibt 1 Tropfen der Lösung erst nach kurzem Kochen mit 1 ml 1 n HCl eine positive Reaktion mit Neßler's Reagenz.

Die äthanolische Lösung wird im Vakuum eingeeengt und zur Entfernung restlichen Wassers 2 mal hintereinander in je 10 ml abs. Benzol aufgenommen, das Lösungsmittel wieder im Vakuum abgezogen und der harzige, gelbfarbene Rückstand im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 1,15 g Cyklohexyl-guanidinium-Farnesyl-phosphamidat in Form eines spröden, glasigen Harzes. Das Rohprodukt wird als solches in die nächste Reaktion eingesetzt.

Farnesyl-pyrophosphat

Das Rohamidat wird unter schwachem Erwärmen in einem Gemisch von 1,0 ml dest. o-Chlorphenol (Sdp. 12 mm = 60°) und 1,0 ml abs. Pyridin gelöst, in ein 10 ml Zentrifugenglas mit Schliff überführt und zweimal mit je 1 ml Gemisch nachgespült. Unter magnetischem Rühren wird ein Gemisch von 1,15 g (10 mM) 85 proz. H_3PO_4 zugetropft, das Glas verschlossen, durch Schütteln homogenisiert und 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Nach beendeter Reaktion wird das Gemisch in ein großes Zentrifugenglas gegossen und mit 30 ml mit NH_3 bei 0° gesättigtem Aceton und 30 ml Aceton versetzt, und die ausgefallenen Ammonsalze abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Aceton wird der Rückstand im Vakuum getrocknet (1,7 g) (das Waschaceton enthält nur 87 μM = (ca. 1%) Phosphat).

Die Ammonsalze werden in einem 10 ml Zentrifugenglas in 4 ml H_2O gelöst. Zur Entfernung der Hauptmenge des anorg. Phosphats wird die Lösung einer 4-stufigen Craig-Verteilung zwischen Collidin/Wasser unterworfen: Die wäßrige Lösung (4 ml) wird mit 4 ml trockenem Collidin versetzt, gründlich geschüttelt, die Emulsion durch kurzes Zentrifugieren gebrochen und die obere (Collidin) Phase auf ein zweites Zentrifugenglas überpipettiert, das 2 ml Wasser enthält. Wiederum wird geschüttelt, die obere Phase nach dem Zentrifugieren hintereinander in zwei weiteren Zentrifugengläsern mit je 2 ml Wasser gewaschen und zuletzt in

einen 250 ml Scheidetrichter überführt. Anschließend werden die Extraktions- und Waschoperationen über die 4 hintereinander geschalteten Gläschen 3 mal mit je 3 ml wassergesättigtem Collidin wiederholt. Die vereinigten, gewaschenen Collidinextrakte werden mit 100 ml Äther und 1 ml konz. NH_3 versetzt und geschüttelt, wobei sich zwei Phasen bilden. Nach Abtrennung der unteren, wäßrigen Phase wird die ätherische Schicht nochmals mit 2 ml Wasser und 0,2 ml konz. NH_3 nachextrahiert. Die vereinigten wäßrigen Extrakte werden mit 20 ml Äther gewaschen. Die schwach gelbliche Lösung (Vol. 16 ml) enthält 410 μM Farnesyl-pyrophosphat (41% d.Th.), 394 μM Farnesyl-phosphat und kein anorganisches Phosphat. Zur Entfernung des Farnesyl-phosphats wird das vorgereinigte Gemisch einer präparativen Papierchromatographie unterworfen: Die Lösung wird gefriergetrocknet (317 mg Trockengut), in 1,0 ml 0,01 m NH_3 aufgenommen und auf 6 Bogen Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) auf je 40 cm Startlinie aufgetragen. Lösungsmittel: n-Propanol/konz. NH_3 / H_2O (8:1:1); 13 Std. aufsteigende Chromatographie. Nach Entwicklung der Leitstreifen wird die Farnesyl-pyrophosphat-zone (R_f 0,35) ausgeschnitten und im Kühlraum (+ 4°) über Nacht mit 0,01 m NH_3 eluiert. Die vereinigten Eluate werden gefriergetrocknet und der trockene Rückstand in 4 ml 0,01 m NH_3 gelöst (330 μM Farnesyl-pyrophosphat).

Zur Kristallisation wurde die Lösung bei 40° mit 1,0 ml Methanol versetzt. Beim Abkühlen im Eisbad setzte die Kristallisation des Ammonium-Farnesyl-pyrophosphats ein. Nach mehreren Stunden wurden die Kristalle im Kühlraum abzentrifugiert und mit 3 ml Aceton gewaschen. Das Rohprodukt wurde zur Umkristallisation in 3 ml 0,01 n NH_3 gelöst, bei Raumtemperatur mit 2 ml Alkohol und 2 ml Aceton versetzt und die Lösung von geringen Mengen eines amorphen Niederschlags durch Zentrifugieren befreit. Nach dem Zusatz von weiteren 1,5 ml Aceton wird im Eisbad gekühlt, wobei die Kristallisation des Triammoniumsalzes des Farnesyl-pyrophosphats zu rechteckigen Blätt-

chen einsetzt. Die Kristallisation wird bei -15° vervollständigt. Dann werden die Kristalle abzentrifugiert, mit je 5 ml Aceton und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 90 mg (200 μ M, 20% d.Th.)

Schmp.: $107-114^{\circ}$ (unscharf.Zers.)

$(\text{NH}_4)_3 \cdot \text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} ; \text{C}_{15}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}_2$ (451,5)

Ber. C 39,92 H 8,71 N 9,31 P 13,73

Gef. C 40,69 H 8,50 N 8,81 P 13,65

Bei der papierchromatographischen Analyse wanderte die Verbindung als einheitlicher Fleck (R_f 0,35) und erwies sich als frei von Farnesyl-phosphat (R_f 0,45) und anorg. Phosphat (R_f 0,00)

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde das Salz in 0,01 m KHCO_3 zu einer Konzentration von 0,01 m gelöst. In dieser Lösung hielt sich die Substanz im eingefrorenen Zustand monatelang unverändert.

2. Substrate, Vergleichssubstanzen und Hilfsenzyme

Triammonium-Geranyl-pyrophosphat war eine Gabe von Herrn Dr.H.Eggerer. Die Substanz wurde in 0,01 m KHCO_3 zu einer Konzentration von 0,01 m gelöst.

$\text{Ag}_3-1-^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat wurde nach der Methode von Eggerer⁴⁴⁾ dargestellt. $\text{Ag}_3-^{32}\text{P}$ -Isopentenyl-pyrophosphat wurde auf demselben Wege aus Isopentenyl-phosphorsäureamid und $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ gewonnen.

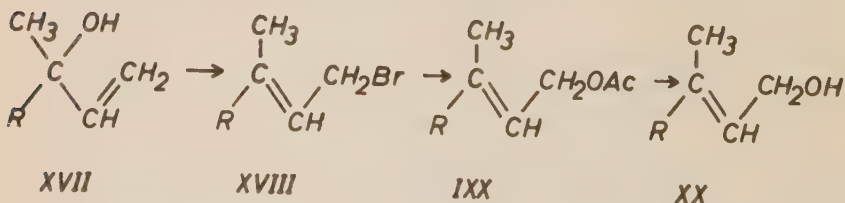
Die entsprechenden Kaliumsalze wurden durch Zersetzung mit einem Kationen-Austauscherharz gewonnen: 58,5 mg (0,1 mM) Ag_3 -Isopentenyl-pyrophosphat werden mit 3 g Dowex 50 (H^+ -Form) in 5,0 ml H_2O suspendiert und 1 Std. bei 4° geschüttelt. Die Suspension wird dann über eine Säule von 2 g frischem Dowex 50 (H^+ -form) bei 4° filtriert und mit Wasser bis zur Neutralreaktion nachgewaschen.

Das Filtrat wird mit 0,3 ml 1 nKOH versetzt und im Vakuum eingengt. Nach der Gehaltsbestimmung mittels Phosphatanalyse S. 70, Ausbeute 95%) wird die Lösung zu einer Konzentration von 0,01 m gebracht. Die spezifische Radioaktivität des markierten Isopentenyl-pyrophosphats für den Scintillationszähler wurde mit dem im Laufe der Synthese als Zwischenprodukt gewonnenen 1-¹⁴C-Isopentenol bestimmt.

Handelsübliches Jodacetamid (Fp 75-90°, unscharf) wurde aus H₂O umkristallisiert (Schmp. 92-94°, Lit ⁸⁰): 95°). Für die Versuche wurden stets frischbereitete 0,2 molare Lösungen in H₂O verwendet.

TPNH, Na-Glucose-6-Phosphat, Rinderserumalbumin und Zwischenferment (als kristalline Suspension, 2 mg Protein/ml) wurden von der Fa. C.F. Boehringer & Söhne, GmbH., Mannheim, erhalten. K₂-Mg-ÄDTA stammte von der Fa. Merck, Darmstadt.

Die als Vergleichs- und Trägersubstanzen benötigten Terpenalkohole stammten aus einer großzügigen Spende Dr. O. Islers, Fa. F. Hoffmann La Roche & Co., Basel. Bei den synthetischen Polyterpenalkoholen⁴⁸⁾ handelte es sich durchwegs um die tertiären Alkohole (XVII).



Aus diesen wurden die primären Alkohole durch Anwendung einer Modifikation der Methode von Ruzicka^{48,60)} erhalten. Dabei werden die tertiären Alkohole mit PBr₃ in Pyridin unter Umlagerung in die primären Bromide (XVIII) überführt. Die anschließende Reaktion mit wasserfreiem K-Acetat in Aceton führt zu den primären Essigsäure-estern (XIX) aus denen durch Verseifung mit KOH

die primären Alkohole (XX) gewonnen werden:

Geranylgeraniol: Ein Gemisch von 3,49 g (12 mM) Geranyl-linalool und 316 mg (4,0 mM) abs. Pyridin (dreimal über KOH destilliert) wurde unter magnetischem Rühren, Feuchtigkeitsausschluß und Kühlung auf -15° (Eiskochsalzbad) zu 0,43 ml (1,21 g, 4,5 mM) frisch destilliertem PBr_3 getropft. Der dabei gebildete, kristalline Brei wird anschließend 1 Std. bei -15° und dann 12 Std. bei Raumtemperatur weitergerührt.

Das bräunliche, klare Reaktionsgemisch wird mit 30 ml Petroläther in einen Scheidetrichter gespült und mit 15 ml eiskalter 1 n Na_2CO_3 -Lösung neutral gewaschen. Die gelbliche Petrolätherschicht wird hintereinander mit je 10 ml 0,5 n H_2SO_4 , 5 ml 0,5 n NaHCO_3 und 10 ml H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum hinterbleiben 3,90 g rohes Geranylbromid.

Dieses wird in 40 ml abs. Aceton (über CaCl_2 getrocknet, destilliert) aufgenommen und zusammen mit 6 g (61 mM) wasserfreiem Kalium-Acetat (12 Std. bei 80° und 0,5 Torr über P_2O_5 getrocknet) 4 Tage bei 31° im Brutraum geschüttelt.

Nach beendeter Reaktion wurde vom ausgeschiedenen KBr und überschüssigen K-Acetat abfiltriert, der Rückstand mit 10 ml Aceton gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 30 ml Petroläther ($50-70^{\circ}$) aufgenommen, von ausgeschiedenem K-Acetat abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum verjagt. Der ölige Rückstand (4,91 g) ergab eine positive Hydroxamsäure-Reaktion mit FeCl_3 nach dem Erwärmen eines Tropfens mit Hydroxylamin und wanderte im Papierchromatogramm (S & S 2040 b, paraffiniert, Fließmittel 80 proz. Aceton) als einheitlicher Fleck R_f 0,47 (Geranyllinalool, R_f 0,74; vgl. Tabelle 4, S. 31).

Zur Verseifung des Geranylgeranyl-acetats wurde das Öl 3 Std. mit 80 ml 5 proz. KOH in 70 proz. Methanol unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktions-

gemisch 3 mal mit je 20 ml Petroläther extrahiert und die organische Phase anschließend nacheinander mit je 20 ml 0,5 n H_2SO_4 , 0,5 n NaHCO_3 und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über geglühtem Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 3,15 g (10,8 mM, 90% d.Th.) eines braungelben Öls, das papierchromatographisch als einheitlicher Fleck wanderte (R_f 0,83) und nur geringe Spuren von Geranyllinalool (R_f 0,74) enthielt.

Auf demselben Wege ergaben 424 mg Farnesyllinalool 373 mg (88% d.Th.) Farnesylgeraniol, und 1,54 g Farnesylnerolidol 1,36 g (88% d.Th.) Farnesylfarnesol.

Natürliches Farnesol und Nerolidol wurden von der Fa. Givaudan & Cie., Vevey, Schweiz, Squalen von der Fa. Light & Co., Hamburg, bezogen.

Das als Vergleichs-Substanz benötigte Geranyl- α -terpineol bzw. α -Bisabolol wurde nach einer Modifikation der Methode von Ruzicka⁶³⁾ dargestellt:

200 mg (0,68 mM) synth. Geranyllinalool wurden bei 0° mit 0,4 ml 85 proz. Ameisensäure versetzt und 15 Std. bei 4° intensiv mit einem Magnetrührer emulgiert. Dann wurden 2 ml Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 mal mit je 3 ml Petroläther (50-70°) ausgezogen. Die mit 2 ml 0,5 n KOH gewaschenen, vereinigten Petrolätherextrakte wurden durch Abblasen im Stickstoff-Strom eingengt und im Vakuum von letzten Lösungsmittelresten befreit. Der Rückstand wurde zur Verseifung in 2 ml 10 proz. äthanolischer KOH gelöst und 2 Std. unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung wurde mit 2 ml Wasser verdünnt und das ausgeschiedene Öl durch viermaliges Ausschütteln mit je 3 ml Petroläther extrahiert. Die mit 2 ml Wasser gewaschenen, vereinigten Petrolätherextrakte wurden über eine Säule von 10 g Al_2O_3 (Woelm, neutral, Akt. Stufe II in Petroläther aufgezogen 2,5 cm² · 4 cm) filtriert, wobei die Kohlenwasserstoffe durchliefen. Nach gründlicher Wäsche mit Petroläther (50 ml) wurden die adsorbierten Alkohole mit 50 ml Aceton eluiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum hinterblieben 145 mg eines schwach gelblichen Öls; der Vorlauf ergab 10 mg eines farblosen Öls. Lösungen

beider Fraktionen in Aceton (Konz. = 20 mg/ml) wurden hergestellt und je 0,01 ml auf paraffiniertem Papier mit 80 proz. Aceton als Fließmittel chromatographiert. Der Vorlauf bestand aus einer einzigen, langsam wandernden Komponente, die man nach den Befunden Ruzickas⁶³⁾ und nach dem Verhalten bei der Säulenchromatographie wohl als Geranylocimen, das höhere Isoprenologe des Farnesens, ansprechen darf. Das Acetoneluat bestand aus einem Gemisch von Geranylgeraniol, Geranyllinalool und einer langsamer wandernden Verbindung, bei der es sich nur um das Cyclisierungsprodukt --- Geranyl- α -terpineol, das höhere Isoprenologe des α -Bisabolols --- handeln kann.

Auf analogem Wege wurde aus Nerolidol ein Gemisch von Farnesol, Nerolidol und -Bisabolol erhalten. Im Petroläthereluat befand sich Farnesen.

Substanz	R _f	Substanz	R _f
Geranylgeraniol	0,83	Farnesol	0,93
Geranyllinalool	0,74	Nerolidol	0,87
Geranyl- α -terpineol	0,53	α -Bisabolol	0,78
Geranylocimen	0,03	Farnesen	0,07

Für die Überlassung von 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-4-chlorid sei an dieser Stelle Herrn Dr.E.Hecker (Max Plank Institut für Biochemie, München) herzlich gedankt.

Als Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase diente die angereicherte Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase, oder das im Anreicherungsverfahren beschriebene undialysierte Toluolautolysat.

Die Squalensynthetisierende, partikuläre Fraktion aus Bäckerhefe wurde durch eine Modifikation der Methode von Utter et.al.⁸¹⁾ gewonnen:

4 mal 5 g frische, ungepreßte Oberkotszauer Bäckerhefe werden zusammen mit je 15 g Glasperlen (31/10) und

je 23 ml einer eiskalten Lösung, die 1 proz. NaCl, 0,2 m Tris/HCl-puffer pH 8,0 und 0,001 m K-ÄDTA enthält, 40 Sek. unter Kühlung mit Kohlensäure in dem von Mergenthaler und Schlossmann⁸²⁾ beschriebenen Zellhomogenisator zerschlagen (Endtemp. 4-7°). Die trüben Überstände werden von den Glasperlen abdekantiert und vereinigt; die Rückstände werden mit je 5 ml einer eiskalten Lösung von 1 proz. NaCl und 0,001 m K-ÄDTA nachgewaschen. Die vereinigten Lösungen werden zur Entfernung von intakten Zellen und Zelltrümmern 15 Min. bei 3000.g zentrifugiert und nach dem vorsichtigen Abdekantieren nochmals zentrifugiert. Anschließend werden die Partikel durch hochtouriges Zentrifugieren (15 Min. bei 27000.g) sedimentiert und der opaleszierende Überstand verworfen. Zur Entfernung von löslichen Enzymen wird der Rückstand 3 mal mit Hilfe eines Plexiglas-Homogenisators in je 12 ml einer eiskalten Lösung von 1 proz. NaCl, 0,01 m Tris/HCl-puffer pH 8,0, 0,001 m K-ÄDTA suspendiert und jeweils wieder abzentrifugiert. Für die Versuche wurden die gewaschenen Partikel zuletzt in 3 ml des gleichen Puffers zu einer gleichmäßigen Suspension homogenisiert. Als willkürliches Maß für die Konzentration der beigefarbenen Suspension diente die optische Trübungsmessung eines Aliquots in 2 ml des gleichen Puffers bei 578 mμ und einem Lichtweg von 1 cm. In der Vergleichsküvette befand sich reine Pufferlösung. Unter diesen Bedingungen entsprach eine Extinktion von $\Delta E_{578 \text{ m}\mu} = 0,10$ einer Ausgangsmenge von 80 mg Hefe (Feuchtgewicht).

Saure Phosphatase, die nach der Methode von Schmidt⁸³⁾ aus Prostata angereichert wurde, stammte von Dr. U. Henning, dem an dieser Stelle herzlich dafür gedankt sei.

3. Anreicherung der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

a) Der Enzymtest

40 μM K-PO_4 -puffer pH 6,0, 4 μM MgCl_2 , 6 μM $\text{K}_2\text{-Mg-ADTA}$, 12 μM Jodacetamid, 1 mg Rinderserumalbumin und Enzymlösung (0,5-1 mg Protein) werden in einem 10 ml Zentrifugenglas zusammen mit Wasser in einem Volumen von 0,5 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert, um die Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase wirksam auszuschalten. Nach Zusatz von 0,15 μM $(\text{NH}_4)_3\text{-Farnesyl-pyrophosphat}$ wird die Reaktion durch Zusatz von 0,06 μM $\text{K}_3\text{-1-}^{14}\text{C-Isopentenyl-pyrophosphat}$ (4900 IpM) eingeleitet (Endvol. = 0,6 ml).

Nach 30 Min. bei 37° wird die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol/Wasser abgebrochen. Nach Zusatz von je 0,01 ml einer 2 proz. Lösung von Geranylgeraniol bzw. Geranyllinalool in Aceton wird die alkalische Lösung mit 0,3 ml 70 proz. HClO_4 auf ca. pH 1 angesäuert. Nach 10 Min. wird das saure Reaktionsgemisch 3 mal mit je 2 ml Petroläther ($50\text{-}70^\circ$) extrahiert. Dazu werden die Röhrchen mit Polyäthylen-Stopfen verschlossen --- diese sind den gebräuchlichen Gummistopfen deshalb vorzuziehen, weil sie keine UV-absorbierenden Verunreinigungen an den Petroläther abgeben -- und nach gründlichem Schütteln zur Brechung der Emulsion kurz zentrifugiert. Die obere Petrolätherschicht wird in ein zweites Zentrifugenglas überpipettiert, das 2 ml 0,5 n KOH enthält. Die vereinigten Petrolätherextrakte werden mit der Kalilauge neutralgewaschen, in ein 15 ml Meßgefäß überführt, mit 5 ml Scintillatorlösung (0,05 g 1,4-Bis-2-(5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol und 2 g 2,5-Diphenyl-oxazol in 500 ml trockenem Toluol) versetzt und im Scintillationszähler (Tricarb liquid scintillation spectrometer, Modell M 314, Packard Instruments, Coy.) nach einer vorgeschalteten Kühlperiode von 30 Min. auf 5% Genauigkeit ausgezählt.

b) Reinigungsverfahren

Zur Proteinbestimmung wurde durchwegs die Biuretmethode nach Beisenherz et.al.⁸⁴⁾ verwendet.

Als Ausgangsmaterial wurde ungepreßte Bäckerhefe (Oberkotzau) verwendet. Die Erfahrung zeigte, daß eine Hefe, die vor der Verwendung 2-3 Wochen im Kühlraum bei 4° gelagert worden war, bessere Ausbeute an Protein und Enzym ergab als frische Hefe.

Autolyse: 1 kg gelagerte Bäckerhefe wurde auf 37° gebracht und mit 60 ml Toluol gründlich durchfeuchtet. Nach 45 Min. bei 37° wird die klebrige Masse mit 50 ml Wasser angerührt und unter gelegentlichem Umrühren weitere 45 Min. bei 37° gehalten. Dann wird die lebhaft gärende Suspension auf Raumtemperatur gebracht und unter Rühren mit 5 m KOH auf pH 7,2 - 7,4 (spezielles Indikatorpapier, pH-Bereich: 6,5 - 8,0 Fa. Merck) gebracht und für die nächsten 2 Std. auf diesem pH gehalten.

Dialyse: Nach beendeter Autolyse wird hochtourig abzentrifugiert und der braungefärbte Überstand bei 4° 4 Std. gegen 10 l 0,01 m K_2HPO_4 , 0,001 m K-ÄDTA und anschließend 10 Std. bei 4° gegen 0,01 m K_2HPO_4 dialysiert. (Vol = 610 ml; Protein = 9,7 mg/ml).

Säurefällung: Das Dialysat wird bei 0° mit 3,6 ml 5 n Essigsäure (Glaselektrode) auf pH 5,0 gebracht und 30 Min. gerührt. (Der grauviolette Niederschlag wird durch hochtouriges Zentrifugieren abgetrennt und der abdekantier- te Überstand mit 1,4 ml 5 n KOH auf pH 5,5 zurückgebracht (Vol = 580 ml; Protein = 6,8 mg/ml).

Reinigung mit $Al(OH)_3$ -gel: Das Filtrat der Säurefällung wird bei 0° tropfenweise mit 122 ml $Al(OH)_3$ -Gel⁸⁵⁾ (Trockengewicht): 16,6 mg/ml) bis zu einem Verhältnis Gel-Trockengewicht/Protein = 0,5 versetzt und 1 Std. gerührt. Das Gel wird hochtourig anzentrifugiert und der hellgelbe Überstand mit 1,5 ml 5 m KOH auf pH 7,0 zurückgebracht (Vol = 645 ml; Protein = 2,4 mg/ml).

Ammoniumsulfatfällung: Durch allmähliche Zugabe von 233 g Ammoniumsulfat bei 0° und unter mechanischem Rühren

wird die erste Fraktion (0-60% Sättigung) gefällt, nach 30 Min. Rühren hochtourig abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird mit 49 g Ammoniumsulfat auf 70 proz. Sättigung gebracht, nach 30 Min. Rühren abzentrifugiert, in 30 ml 0,01 M K_2HPO_4 aufgenommen und 12 Std. bei 4° gegen 10 l 0,005 M K_2HPO_4 dialysiert. Das hellgelbe Dialysat (Vol = 39 ml; Protein = 15,0 mg/ml) wird auf 20 Gläschen verteilt und bei -15° in eingefrorenem Zustand aufbewahrt, wo es sich 3 Monate ohne Aktivitätsverluste hält. Im Folgenden wird dieses Präparat als "AS₂" bezeichnet.

Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung in den verschiedenen Fraktionen ist in Tabelle 1, S.17 zusammengefaßt.

c) Enzymabhängigkeit

Mit der gereinigten Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂) wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Menge des zugesetzten Enzyms gemessen. Die Messung erfolgte mit dem auf S.87 beschriebenen Enzymtest. Die Meßergebnisse sind in Abb2, S.17 wiedergegeben.

4. Substratstudien

a) Die biologische Aktivität von synthetischem Farnesyl-pyrophosphat in der Squalensynthese

In je ein 10 ml Zentrifugenglas wurden 4 mal je 20 µM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 6 µM $MgCl_2$, 6 µM K_2 -Mg-ÄDTA, 3 µM Jodacetamid; 0,4 µM TPN; 2 µM Na-Glucose-6-Phosphat; zusammen mit 10 µg Zwischenferment, Toluolautolysat (0,85 mg Protein), 0,02 ml Hefepartikelsuspension (Trübung: $\Delta E_{578\text{ m}\mu} = 0,17$) und Wasser in einem Endvolumen von 0,5 ml 10 Min. bei 37° inkubiert. Nach Zusatz der in Abb.1, S. 13 angeführten Mengen $(NH_4)_3$ -Farnesyl-pyrophosphat und je 0,4 µM $(NH_4)_3$ -Geranyl-pyrophosphat, wurde die Reaktion durch Zugabe von je 0,06 µM K_3 -1- ^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM) eingeleitet (Endvolumen = 0,6 ml).

Nach 10 Min. bei 37° wurde die Reaktion durch Zusatz von 1 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol abgebrochen.

Quantitative Bestimmung von radioaktivem Squalen und Farnesyl-pyrophosphat: Dem alkalischen Reaktionsgemisch werden je 0,2 mg Squalen (0,01 ml einer 2 proz. Lösung in Aceton) als Trägermaterial zugesetzt. Anschließend wird das Squalen durch dreimalige Extraktion mit je 2 ml Petroläther ($50-70^{\circ}$) quantitativ extrahiert und nach der Wäsche mit 2 ml Wasser wie auf S. 87 beschrieben, gezählt. Das im alkalischen Reaktionsgemisch verbliebene Farnesyl-pyrophosphat wird nach Zusatz von je 0,2 mg Farnesol und Nerolidol als Träger (0,01 ml einer 2 proz. Lösung in Aceton) durch Zugabe von 0,3 ml 70 proz. HClO_4 rasch hydrolysiert, wie Geranylgeraniol (S. 87) mit Petroläther extrahiert, neutralgewaschen und gezählt.

Die Berechnung der theoretischen Isotopenverdünnung erfolgte unter folgender, vereinfachender Annahme: Die gemessene Kinetik der Squalensynthese aus Geranyl-pyrophosphat und markiertem Isopentenyl-pyrophosphat wird in zwei zeitlich getrennt ablaufende Teilschritte aufgeteilt:

- a. Synthese von $1-^{14}\text{C}$ -Farnesyl-pyrophosphat aus Geranyl-pyrophosphat und $1-^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat.
- b. Reduktive Dimerisierung von $1-^{14}\text{C}$ -Farnesyl-pyrophosphat zu $1,1'-^{14}\text{C}$ -Squalen, mit einer Geschwindigkeit, die von der zugesetzten Menge der synthetischen Verbindung unabhängig ist.

Den Berechnungen werden die Messwerte des Kontrollversuchs zugrunde gelegt. Die Ermittlung der im Teilschritt a gebildeten Menge $1-^{14}\text{C}$ -Farnesyl-pyrophosphat erfolgt durch Addition der Radioaktivität im Squalen und im Farnesyl-pyrophosphat. Mittels der bekannten spez. Radioaktivität des eingesetzten Isopentenyl-pyrophosphats (82 IpM/ μM) erfolgte die Umrechnung von Radioaktivität in μM . Der molare Umsatz von radioaktivem Farnesyl-pyrophosphat zu Squalen in Schritt b wird auf die gleiche

Weise aus der Radioaktivität im Squalen (Kontrollversuch) berechnet. Aus der Verdünnung des radioaktiven Farnesyl-pyrophosphats durch Zusatz der synthetischen Verbindung läßt sich die Verminderung der spez. Radioaktivität des Farnesyl-pyrophosphat-pools ermitteln. Bei gleichem molaren Umsatz von Farnesyl-pyrophosphat in Schritt b ergibt sich somit die Abnahme der Radioaktivität im Squalen und daraus die Zunahme der Radioaktivität im restlichen Farnesyl-pyrophosphat. Meßergebnisse und berechnete Werte sind in folgender Tabelle aufgeführt:

	synth.FaPP zugesetzt	Gesamt FaPP (a)	FaPP um- gesetzt (b)	IpM im Squalen	IpM im FaPP	IpM in Squalen + FaPP		
	muM	muM	muM	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber. Gef.
1.	---	25	14,2	(1164)=	1164	(888)=888	(2052)=2052	
2.	19	44	"	656	665	1396	1365	" 2030
3.	38	63	"	462	537	1590	1592	" 2129
4.	76	91	"	320	306	1732	1618	" 1924

Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb.1, S. 13 wiedergegeben.

b) Bestimmung von Farnesyl-pyrophosphat mit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase

80 uM K_2PO_4 -puffer pH 6,0, 8 uM $MgCl_2$, 12 uM $K_2Mg-ADTA$, 12 uM Jodacetamid, 2 mg Serumalbumin, Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂, 3 mg Protein) wurden in einem Volumen von 1,0 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Nach Zusatz von je 16,8 bzw. 33,6 50,4, 67,2 muM $(NH_4)_3$ -Farnesyl-pyrophosphat wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,12 uM $K_3-1-^{14}C$ -Isopentenyl-pyrophosphat (28600 IpM) gestartet (Endvolumen = 1,2 ml). Nach 4 Std. bei 37° wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol abgebrochen und wie auf S.87 beschrieben angesäuert, mit Petroläther extrahiert und ausgezählt.

Die Lösung des synthetischen Farnesyl-pyrophosphats war für den Versuch frisch durch Einwaage des Ammoniumsalzes hergestellt und der Gehalt durch Phosphatanalyse

bestimmt worden. Papierchromatographische Analyse einer Probe in Collidin/Wasser 3:1 bewies, daß die Verbindung frei von anorg. Phosphat und Farnesyl-phosphat war.

Folgende Tabelle gibt die Meßergebnisse und die Berechnung der biologischen Aktivität des synthetischen Farnesyl-pyrophosphats wieder:

	FaPP zugesetzt µM	IpM im GegePP	FaPP umgesetzt (berech.)	
			µM	%
1.	16,8	2770	11,7	69
2.	33,6	5140	21,6	64
3.	50,4	7320	30,8	61
4.	67,2	10650	44,7	67

In Abb. 4, S. 20 sind die Ergebnisse in graphischer Darstellung aufgeführt.

c) Unwirksamkeit von Farnesyl-phosphat

40 µM K-PO₄-puffer pH 6,0, 4 µM MgCl₂, 6 µM K₂-Mg-ÄDTA, 12 µM Jodacetamid, 1 mg Serumalbumin und Geranyl-geranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂, 0,98 mg Protein) wurden in einem Volumen von 0,5 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Neben einem Kontrollversuch ohne Farnesyl-pyrophosphat wurden in verschiedene Gläschen je 0,2 µM (NH₄)₃-Farnesyl-pyrophosphat bzw. 0,2 µM Na-cyklohexylammonium-Farnesyl-phosphat (0,01 M Lösung in Methanol) und ein Gemisch von je 0,2 µM der beiden Ester zugesetzt. Die Reaktion durch Zugabe von 0,06 µM K₃-1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat eingeleitet. Endvolumen = 0,6 ml. Nach 30 Min. bei 37° wurde die Reaktion wie auf S. 87 abgestoppt, mit Petroläther extrahiert und gezählt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 2, S. 19 aufgeführt.

d) Farnesyl-pyrophosphat-Abhängigkeit

pH 6,0: Die Ansätze, Inkubation, Extraktion und Zählung erfolgten wie im oben beschriebenen Versuch. Die Zu-

sätze von Farnesyl-pyrophosphat und die Berechnung der Michaeliskonstante sind in der unten stehenden Tabelle wiedergegeben. In den für Farnesyl-pyrophosphat verwendeten Konzentrations-Werten (S) ist nur der biologisch aktive Anteil von 65% berücksichtigt.

	$(\text{NH}_4)_3\text{-}$ FaPP einge- setzt uM	S (korr) M/10 ³	1/S 1/M ³	IpM im GegePP	V	1/V
				muM GegePP Std		10 ⁻² Std muM GegePP
1.	0,015	0,016	61,6	204	5,0	20,0
2.	0,03	0,033	30,8	405	9,9	10,1
3.	0,06	0,065	15,4	842	20,6	4,9
4.	0,12	0,13	7,7	1786	43,6	2,3
5.	0,24	0,26	3,85	1927	47,0	2,1
6.	0,48	0,52	1,93	1636	40,0	2,5
7.	0,96	1,04	0,96	1511	37,0	2,7

Die Auftragung der Radioaktivität im Geranylgeranyl-pyrophosphat gegen die korrigierte Konzentration des Farnesyl-pyrophosphats (S) ist in Abb.5, S.21 wiedergegeben. Die Michaeliskonstante wurde durch Auftragung von 1/V gegen 1/S und durch graphische Extrapolation der Geraden nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁵⁾ ermittelt:

$$K_{M_{\text{pH } 6,0}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ M/l}$$

pH 8,0: Die Ansätze unterscheiden sich von den oben beschriebenen durch den Ersatz des Puffers durch 20 uM Tris/HCl-puffer pH 8,0. Inkubation, Aufarbeitung und Zählung erfolgter wie oben. Die Zusätze von $(\text{NH}_4)_3\text{-Farnesyl-pyrophosphat}$ und die Meßergebnisse sind in folgender Tabelle (siehe S.94) angeführt!

	(NH ₄) ₃ - FaPP ein- gesetzt uM	S (korr) M/l .10 ⁻³	1/S 1/M ₃ .10 ³	IpM im GegePP	V muM GegePP Std.	1/V 10 ⁻² Std. muM GegePP
1.	0,015	0,016	61,6	162	4,0	25,0
2.	0,03	0,033	30,8	221	5,4	18,5
3.	0,06	0,065	15,4	536	13,1	7,6
4.	0,12	0,13	7,7	606	14,7	6,8
5.	0,24	0,26	3,85	768	18,7	5,4
6.	0,96	1,04	0,96	647	15,8	6,3

Aus der Auftragung von 1/V gegen 1/S wurde die Michaeliskonstante wie oben beschrieben graphisch ermittelt:

$$K_{M_{pH\ 8,0}} = 0,8 \cdot 10^{-4} \text{ M/l}$$

e) Isopentenyl-pyrophosphat-Abhängigkeit

20 uM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 6 uM MgCl₂, 6 uM K₂-Mg-ÄDTA, 12 uM Jodacetamid, 1 mg Serumalbumin, Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂, 0,98 mg Protein) werden zusammen mit Wasser in einem Endvolumen von 0,5 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Durch Zusatz von den in der folgenden Tabelle aufgeführten Mengen K₃-1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat (2,45 · 10⁵ IpM/uM) und je 0,15 uM (NH₄)₃-Farnesyl-pyrophosphat wird die Reaktion in Gang gebracht und nach 30 Min. bei 37° wie auf S.87abgestoppt. Parallel zu jedem Ansatz wurde der Blindwert durch Inkubation der entsprechenden Menge Isopentenyl-pyrophosphat ohne Zusatz von Farnesyl-pyrophosphat ermittelt. Nach dem Ansäuern und der auf S.87 beschriebenen Aufarbeitung und Auszählung wurden die Meßwerte durch Subtraktion der entsprechenden Blindwerte korrigiert. Die korrigierten Werte sind in der Tabelle (siehe S.95) aufgeführt.

	IspPP einge- setzt uM	S M/1 ⁻³ .10 ⁻³	1/S 1/M ³ .10 ³	IpM (korr) im GegePP	V muM GegePP Std.	1/V 10 ⁻² Std muM GegePP
1.	0,01	0,017	60	1442	11,1	9,0
2.	0,02	0,033	30	2116	16,3	6,2
3.	0,04	0,067	15	3682	28,3	3,5
4.	0,08	0,133	7,5	4496	34,6	2,9
5.	0,16	0,267	3,8	3084	23,7	4,2
6.	0,32	0,533	1,9	1952	15,0	6,7
7.	0,64	1,07	0,94	1490	10,9	9,2
8.	1,28	2,13	0,47	596	6,9	14,5

Die Auftragung der Radioaktivität im Geranylgeranylpyrophosphat gegen die Konzentration von Isopentenylpyrophosphat ist in Abb.6, S.23 wiedergegeben. Durch die Auftragung von 1/V gegen 1/S wurde nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁵⁾ die Michaeliskonstante des Enzyms für Isopentenylpyrophosphat ermittelt:

$$K_{M_{pH\ 8,0}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M/l}$$

5. Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

a) Hemmung der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase durch Jodacetamid

Je 40 uM K-PO₄-puffer pH 6,0, 4 uM MgCl₂, 6 uM K₂-Mg-ÄDTA und 3, bzw. 6 und 12 uM Jodacetamid wurden zusammen mit je 1 mg Serumalbumin und dialysiertem Toluolautolysat (0,97 mg Protein, siehe S.88) in einem Volumen von 0,5 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Einpipettieren von je 0,15 uM (NH₄)₃-Farnesyl-

pyrophosphat und $0,06 \mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{-}1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM) eingeleitet (Endvolumen = $0,6 \text{ ml}$) und nach 30 Min. bei 37° durch Zusatz von 1 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Me- thanol abgebrochen. Zur Ermittlung der entsprechenden Blindwerte wurden dieselben Ansätze wiederholt, diesmal ohne Zusatz von Farnesyl-pyrophosphat. Nach dem auf S.87 beschriebenen Verfahren wurden die Reaktionsgemische aufgearbeitet und gezählt. In Abb.3, S.18 sind die Meßergebnisse in graphischer Darstellung wiedergegeben.

b) Bedarf an Magnesiumionen

Jeder Ansatz enthielt $40 \mu\text{M}$ K-PO_4 -puffer pH $6,0$, 1 mg Serumalbumin, $12 \mu\text{M}$ Jodacetamid und Zusätze von MgCl_2 wie in Abb.7, S.24 aufgeführt. Zusammen mit Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS_2 , je $0,98 \text{ mg}$ Protein) und Wasser in einem Volumen von $0,5 \text{ ml}$ wurden die Ansätze 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Der Start erfolgte durch Zusatz von $0,15 \mu\text{M}$ $(\text{NH}_4)_3$ -Farnesyl-pyrophosphat und $0,06 \mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{-}1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat. Nach 30 Min. bei 37° (Endvolumen = $0,6 \text{ ml}$) wurde die Reaktion wie auf S.24 beschrieben abgestoppt, aufgearbeitet und ausgezählt. Die erhaltenen Meßwerte sind in Abb.7, S.24 diagrammatisch aufgeführt.

c) pH-Optimum

Als Puffer kamen zur Verwendung:

je $40 \mu\text{M}$ K-Acetat -puffer pH $4,0$ und $5,0$; K-PO_4 -puffer pH $6,0$ und $7,0$; und Tris/HCl -puffer pH $8,0$ und $9,0$. Zusätzlich zum jeweiligen Puffer enthielt jeder Ansatz $4 \mu\text{M}$ MgCl_2 , $6 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{-Mg-ÄDTA}$, $3 \mu\text{M}$ Jodacetamid, 1 mg Serumalbumin und $0,98 \text{ mg}$ Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS_2). Nach 15 Min. Vorinkubation in einem Volumen von $0,5 \text{ ml}$ und bei 37° , wurde die Reaktion durch Zusatz von $0,15 \mu\text{M}$ $(\text{NH}_4)_3$ -Farnesyl-pyrophosphat und $0,06 \mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{-}1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM) zu einem Endvolumen von $0,6 \text{ ml}$ gestartet und nach 30 Min. bei 37°

wie auf S.87 beschrieben abgebrochen, aufgearbeitet und die Radioaktivität im Geranylgeranyl-pyrophosphat bestimmt. In Abb.8,S.25 sind die Meßwerte in Form einer Kurve (O) wiedergegeben.

6. Bestimmung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase

a) Der Enzymtest

Die Zusammensetzung der Ansätze entsprach genau den Bedingungen für den Enzymtest der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (vgl. S. 87). Wegen der höheren spezifischen Aktivität der Proteinfractionen bezüglich der Synthese von Farnesyl-pyrophosphat wurden jedoch nur 70-30 ug Protein pro Ansatz eingesetzt. Die Ansätze wurden 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,3 uM $(\text{NH}_4)_3$ -Geranyl-pyrophosphat und 0,06 uM K_3 -1- ^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat (4900 IpM) gestartet (Vol = 0,6 ml) und nach 10 Min. bei 37° durch Zusatz von 1,0 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol abgestoppt. Nach Zusatz von Farnesol und Nerolidol als Träger (je 0,01 ml einer 2 proz. Lösung der Substanzen in Aceton) wurden die Reaktionsgemische wie auf S. 87 beschrieben aufgearbeitet und die Radioaktivität im Farnesyl-pyrophosphat ermittelt.

Als Enzymheinheit wurde diejenige Menge Enzym definiert, die in einer Minute die Synthese von 1 uM Farnesyl-pyrophosphat unter den oben beschriebenen Testbedingungen katalysiert.

Die Aktivitätsbestimmung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase in den verschiedenen Fraktionen des auf S. 88 beschriebenen Anreicherungsgangs für die Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase führt zu den in Tabelle 3, S. 27 wiedergegebenen Meßwerten.

b) pH-Optimum

Die Ansätze des oben beschriebenen Enzymtests wurden durch Ersatz des Puffers durch K-Acetat-puffer für pH 4,0

und 5,0 K-PO₄-puffer für pH 6,0 und 7,0 und Tris/HCl-puffer für pH 8,0 und 9,0 verändert. Im übrigen wurde die Vorinkubation, Inkubation, Aufarbeitung und Auszählung nach demselben Verfahren durchgeführt. Die Meßergebnisse sind in Abb. 8, S. 25 neben der pH-Abhängigkeit der Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase in graphischer Darstellung (Δ) wiedergegeben.

II. Die Identifizierung des Geranylgeranyl-pyrophosphats

1. Präparative Darstellung von 1-¹⁴C-Geranylgeraniol

80 uM K-PO₄-puffer pH 6,0, 8 uM MgCl₂, 12 uM K₂-Mg-ÄDTA, 6 uM Jodacetamid und 1 mg Serumalbumin wurden zusammen mit 3,0 mg Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂) in einem Volumen von 1 ml 15 Min. bei 37° vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,12 uM K₃-1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat (29400 IpM) und 0,3 uM (NH₄)₃-Farnesyl-pyrophosphat zu einem Endvolumen von 1,2 ml in Gang gebracht. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37° wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,13 ml 1 M K₃-ÄDTA pH 6,8 abgestoppt (Endvolumen = 0,1 M). Der Komplexbildner fängt das zur Reaktion benötigte Magnesium ab, stört jedoch nicht die anschließende phosphatatische Spaltung. Diese wird durch Zugabe von 0,8 mg Prostataphosphatase eingeleitet und durch 2-stündige Inkubation bei 37° vervollständigt.

Nach beendeter Spaltung wurde der Ansatz mit 1 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol und 0,2 mg Geranylgeraniol versetzt und 4 mal nach dem auf S. 87 beschriebenen Verfahren mit je 3 ml Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petroläther-Extrakte wurden mit 2 ml Wasser

gewaschen, eine Probe von 0,2 ml mit 6 ml Petroläther und 5 ml Scintillator-Lösung versetzt und wie auf S.87 beschrieben, ausgezählt. (23200 IpM = 79% d.Th.) Zur Kontrolle wurde das alkalische Reaktionsgemisch wie auf S.87 beschrieben auf restliches Geranylgeranyl-pyrophosphat analysiert. Es wurden jedoch nur 1000 IpM (3% d.Th.) gefunden.

Ein parallel laufender, identischer Ansatz wurde nach beendeter Inkubation nicht mit Phosphatase gespalten, sondern direkt mit KOH abgebrochen und nach der Zugabe von je 0,2 mg Geranylgeraniol und Geranyllinalool als Träger, wie auf S.87 beschrieben mit HClO_4 angesäuert, mit Petroläther extrahiert, gewaschen und eine Probe ausgezählt (19100 IpM = 64% d.Th.).

Abb.10, S.32 gibt das Ergebnis der papierchromatographischen Analyse (Methodik S.75) der beiden Spaltprodukte auf paraffiniertem Papier und mit 80% Aceton als Fließmittel wieder. Die Lage der radioaktiven Flecken wurde durch Auszählung des in Streifen geschnittenen Chromatogramms im Radiopapier-Chromatographen (Friesseke & Höpfner FH 452, Linienschreiber PC 120) ermittelt.

2. Darstellung des Geranylgeranyl-4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-4-esters

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Geranylgeraniol wurde nach dem auf S.98 beschriebenen Verfahren dargestellt (28400 IpM = 97% d.Th.), mit 81,2 mg (0,28 mM) synthetischem Geranylgeraniol als Träger verdünnt, in einem 10 ml Schliffröhrchen in 3,5 ml abs. Benzol (über CaH dest.) gelöst und mit 100 mg (0,33 mM) 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-4-chlorid (Schmp. 157-159°, Lit. 162-163°⁶²) versetzt. Durch kurzes Erwärmen auf 40-50° wurde das Säurechlorid gelöst. Die Lösung wurde abgekühlt, 0,06 ml (0,6 mM) abs. Pyridin dazugegeben und das verschlossene Röhrchen 15 Std. bei 31° im Brutraum geschüttelt. Bald nach Zugabe des Pyridins fiel ein

orangefarbener Niederschlag aus.

Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch mit 5 ml Benzol verdünnt und mit 2 ml 0,5 n H_2SO_4 geschüttelt. Der Überstand wurde mit 2 ml Wasser gewaschen und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Zur Entfernung restlichen Wassers wurde der Rückstand 3 mal in je 5 ml abs. Benzol gelöst und das Benzol im Vakuum wieder entfernt. Zuletzt wurde der trockene Rückstand in 2 ml Benzol gelöst und durch Chromatographie an einer Säule von 10 g Al_2O_3 (Woelm, neutral, Akt.Stufe II, in Benzol aufgezogen, $2,5\text{ cm}^2 \cdot 4\text{ cm}$) gereinigt. Durch Entwicklung mit Benzol wurde die orange Bande des Esters eluiert und von einer langsamer wandernden, gefärbten Bande und von der am Säulenkopf adsorbier-ten freien Säure getrennt. Nach Abdestillation des Lösungsmittels im Vakuum hinterblieben 122 mg (82% d.Th.) des rohen Esters (Schmp. $72-74^\circ$). Der Ester wurde 7 mal aus n-Heptan (ca. 1 ml/40 mg Substanz) umkristallisiert, wobei ein konstanter Schmp. von $82-83^\circ$ erreicht wurde (vgl. Tabelle 5, S.37).

$C_{36}H_{41}N_3O_4$ (543,6)	Ber. C	72,91	H	7,60	N	7,73
	Gef. C	73,13	H	7,80	N	8,21

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität wurden von den verschiedenen Fraktionen je zwei Proben von ca. 1 mg auf Aluminiumschälchen eingewogen, in wenig Aceton gelöst und zu einer gleichmässigen Schicht zur Trockne gebracht. Die Radioaktivität wurde im Methandurchflußzähler (Friesseke und Höpfner Modell FH 51) auf 5% Genauigkeit ausgezählt. Die theoretisch erwartete spez. Radioaktivität wurde wie folgt bestimmt: Zuerst wurde das Verhältnis der Zählausbeute der beiden verschiedenen Zählgeräte bestimmt. Dazu wurden gleiche Proben 1- ^{14}C -Palmitinsäure (ca. $8 \cdot 10^3$ IpM) einmal mit einem Gemisch von 6 ml Petroläther und 5 ml Scintillatorlösung versetzt und anschließend im Scintillationszähler (A) ausgezählt, andererseits auf Cu-plättchen aufgetragen und im Methandurchflußzähler (B) gemessen. Der Faktor B/A betrug 1,19.

$$\begin{aligned} \text{spez. Akt. des Geranylgeraniol (M = 290,4)} &= \\ \frac{28400 \cdot 1,19 \cdot 290,4}{81,2} &= 121 \text{ IpM/uM (B)} \end{aligned}$$

$$\text{spez. Akt. des Esters (M = 543,6)} = \frac{121}{0,544} = 222 \text{ IpM/mg (B)}$$

Die Meßwerte sind in Tabelle 5, S.37 wiedergegeben.

3. Darstellung von Geranylgeranyl-³²P-pyrophosphat

In einem 5 mal so großen Ansatz wie auf S. 98 beschrieben, wurden 0,77 uM K₃-³²P-Isopentenyl-pyrophosphat (20000 IpM) und 1,5 uM (NH₄)₃-Farnesyl-pyrophosphat zusammen mit 15 mg Geranylgeranyl-pyrophosphat-Synthetase (Fraktion AS₂) in einem Endvolumen von 6,0 ml 2 Std. lang bei 37° inkubiert.

Nach Zusatz von 0,67 ml 1 m K₃-ÄDTA pH 6,8 (Endkonz. = 0,1 m) zur Bindung des störenden Magnesiums wurde die Lösung zunächst mit 4, dann mit 3 und zuletzt 3 mal mit je 2 ml trockenem Collidin extrahiert. Jeder Collidinextrakt wurde in einer Art 3-stufiger Craigverteilung nach dem auf S. 79 beschriebenen Verfahren über 2 Zentrifugengläser mit je 2 ml Wasser geführt. Die auf diese Weise gewaschenen Collidinextrakte wurden vereinigt, mit 150 ml peroxyd-freiem Äther und 1,0 ml konz. NH₃ geschüttelt, die wäßrige Phase abgezogen und die organische Phase noch 4 mal mit je 5 ml Wasser und 0,5 ml konz. NH₃ nachextrahiert. Die vereinigten, wäßrigen Extrakte wurden einmal mit 50 ml Äther gewaschen, mit 0,02 ml 1 m KHCO₃ versetzt und im Vakuum auf 0,2 ml eingeeengt.

Der Extrakt wurde neben Vergleichs-Substanzen auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) auf 18 cm Startlinie aufgetragen. Nach 1-std. Äquilibrium wurde das Chromatogramm mit Collidin/Wasser (3:1) 12 Std. aufsteigend entwickelt. Zur Sichtbarmachung der phosphathaltigen Vergleichssubstanzen wurde der Ver-

gleichsstreifen nach dem Trocknen mit Molybdat-Perchlorsäurereagens⁷⁹⁾ besprüht, 3 Min. im Trockenschrank auf 85° bis zur beginnenden Vergilbung erhitzt und mit kurzwelligem U.V.-Licht entwickelt. Dabei erscheinen anorg. Phosphat als gelbgrüner, anorg. Pyrophosphat und organische Phosphorsäure-ester als dunkelblaue Flecken auf weißem Hintergrund. Die Lage der radioaktiven Phosphatester wurde durch Auszählung eines ausgeschnittenen Streifens (3,5 cm breit) im Radiopapier-chromatographen ermittelt. (vgl. S. 99) Die Verteilung der Radioaktivität auf dem Chromatogramm und die Lage der ³²P-Geranylgeranyl-pyrophosphat-Zone ist in Abb. 11, S. 40 wiedergegeben. Die Trennung der verschiedenen Phospho- und Pyrophosphorsäure-ester des Colloidin-Extraktes kann auch mittels Hochspannungs-Papierelektrophorese in Pyridin-Acetat-puffer pH 6,2, dem K-ÄDTA zu einer Konz. von 0,001 m zugesetzt wird, durchgeführt werden. Die R_f bzw. R_{PO}-Werte der interessierenden Verbindungen sind in Tabelle⁴⁶, S. 38 aufgeführt.

4. Identifizierung des Pyrophosphat-Rests

Die radioaktive Zone des Geranylgeranyl-³²P-pyrophosphats wurde ausgeschnitten und über Nacht mit 5 proz. konz. NH₃ in 50 proz. Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum (Wasserbad 30°) zur Trockne gebracht, der Rückstand in 2 ml 1,5 m Trichloressigsäure gelöst und 1 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde die Trichloressigsäure quantitativ mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit je 0,5 µM anorg. Phosphat und Pyrophosphat als Träger versetzt, im Vakuum eingengt und auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) auf 6 cm Startlinie neben Vergleichssubstanzen aufgetragen. Nach 1-stg. Äquilibrierens wurde das Chromatogramm mit Isopropanol/Trichloressigsäure/Wasser/konz. NH₃ (70:5:30:0,3) 12 Std. aufsteigend entwickelt. Nach dem Trocknen erfolgte die Sichtbarmachung der Vergleichssubstanzen wie

auf S.102 beschrieben; das Ergebnis der Radioaktivitätsmessung des Streifens ist in Abb.12, S.39 wiedergegeben.

III. Versuche mit 2-Fluormevalonsäure

1. Allgemeine Analysenmethoden

Quantitative Phosphatanalyse wie auf S. 70

Radioaktivitätsbestimmung: ^{14}C - oder ^{32}P -haltige Proben wurden auf Plättchen aufgetragen und, wie in den einzelnen Versuchen näher beschrieben ist, entweder mit einem Endfensterzähler (Superscaler SC/8A , Tracer Lab Inc.) oder mit einem Methandurchflußzähler (Frieseke und Höpfner Modell FH 51) bis zu 5% Genauigkeit ausgezählt. Verluste durch Selbstabsorption wurden durch entsprechende Blindmessungen berücksichtigt. Zur Berücksichtigung der relativ rasch abfallenden Radioaktivität des Phosphors wurde stets ein Standardpräparat mitgezählt.

Qualitative Analyse: Die Trennung der verschiedenen Phosphor- und Pyrophosphorsäure-ester im mikropräparativen Maßstab, oder zum Zweck der Identifizierung wurde durch papierchromatographische Analyse oder mittels der Hochspannungs-Papierelektrophorese erreicht:

Papierchromatographie: Die papierchromatographischen Analysen wurden auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) ausgeführt, das den anderen Papieren, z.B. Whatman 1 oder SS 2043 b (gew.), durch größere Sauggeschwindigkeit und bessere Trennwirkung überlegen ist. Die Reproduzierbarkeit der R_f -Werte schwankt von Packung zu Packung, mit dem Gehalt der Probe an Fremdionen, mit der Menge der aufgetragenen Substanz und mit der Laufzeit. Die relativen R_f -Werte, bezogen auf die Wanderungsstrecke von anorg. Phosphat als Einheit (R_{PO_4}), erwiesen sich

jedoch als relativ unabhängig von diesen Störungen.

Als saures Fließmittel wurde ein Gemisch von tert. Amylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:2) verwendet. Bei absteigender Chromatographie sind nach 14-18 Std. die in dieser Arbeit vorkommenden Phosphorsäure-ester größtenteils voneinander getrennt. Als basisches Fließmittel bewährte sich das von Bandurski et.al.⁸⁶⁾ empfohlene Gemisch aus Methanol/konz.NH₃/Wasser (6:1:3). Die Chromatographie wurde nach der aufsteigenden Methode im Kühlraum bei 4° durchgeführt, und war im allgemeinen nach 12 Std. beendet. Als zweites, basisches Fließmittel wurde auch ein Gemisch aus Äthanol/konz.NH₃/Wasser (8:1:1) verwendet. Mit diesem Lösungsmittel mußten die Chromatogramme im absteigenden Verfahren als Durchlaufchromatogramme entwickelt werden (Dauer: 24-26 Std.).

Die Entwicklung der Phosphatflecken erfolgte wie auf S.102. Bei schwerflüchtigen oder stark adsorbierten Lösungsmittelkomponenten, wie z.B. Essigsäure, empfiehlt sich eine kurze Behandlung mit Wasserdampf vor der Entwicklung, um eine unspezifische Blaufärbung des Papieruntergrunds zu vermeiden. Die Lage radioaktiver Verbindungen wurde durch Auszählung im Radio-Papierchromatographen, wie auf S.99 beschrieben, ermittelt.

Hochspannungs-Papierelektrophorese: wurde in der Apparatur von Wieland u. Pfeleiderer⁸⁷⁾ durchgeführt. In der Praxis bewährte sich das dicke Papier von Macherey & Nagel 214, weil es sehr reißfest ist. Im Falle der Mevalonsäurederivate ist die Verwendung von säuregewaschenem Papier nicht notwendig. Als Puffer dienten Gemische aus Pyridin/Eisessig/Wasser im Verhältnis 100:10:890 (pH 6,2) bzw. 55:55:890 (pH 4,8).

Der Vorteil dieser Puffer besteht darin, daß sämtliche Komponenten flüchtig sind. Bei einem Spannungsgefälle von 35-40 V/cm (80-90 mA) sind nach 90-120 Min. der größte Teil der in dieser Arbeit interessierenden Verbindungen sauber voneinander getrennt. Die Entwicklung der Phosphat-ester erfolgte wie auf S.102 beschrieben.

Mevalonsäure und 2-Fluormevalonsäure werden nach dem Vertreiben der auf dem Papier adsorbierten Essigsäure mit Wasserdampf durch Besprühen mit Methylrot (3 mg/l) in 0,01 m Na-Boratpuffer, pH 8,0, als rote Flecken auf gelbem Hintergrund lokalisiert. Bei richtiger Beladung des Pherogramms (0,1-0,3 μ M Substanz/cm Auftragslinie) wandern die verschiedenen Säuren als 2-5 mm breite Banden zur Anode. Bezogen auf die Wanderungsgeschwindigkeit von anorg. Phosphat als Einheit, sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Säuren, ausgedrückt in R_{PO_4} -Werten, innerhalb enger Grenzen reproduzierbar.

Charakteristische R_f bzw. R_{PO_4} -Werte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Verbindungen sind in den Tabellen 9, S. 51 Tab. 11, S. 57 und Tab. 13, S. 68 wiedergegeben.

2. Substrate und Enzyme

AMP, ADP, ATP, Ag-Ba-Phospho-enolpyruvat, DPNH und TPNH wurden von der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim bezogen. Mevalonsäure wurde nach der Methode von Folkers⁶⁵⁾ synthetisiert und als das Dibenzyläthylen-diammoniumsalz gereinigt (Schmp. 124-126°; Lit. 126°). 2-¹⁴C-Mevaldinsäure und 2-¹⁴C-Mealonsäure wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Eggerer zur Verfügung gestellt.

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase, Myokinase und Milchsäure-Dehydrogenase wurden von der Fa. Boehringer & Söhne, Werk Tutzing, in Form von kristallinen Suspensionen bezogen. Mevalonatkinase⁸⁸⁾, Phosphomevalonatkinase²⁸⁾ und Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase⁸⁸⁾ wurden nach den entsprechenden Vorschriften von Herrn Dr. U. Henning aus Bäckerhefe angereichert. In manchen Versuchen wurden partiell gereinigte Proteinfraktionen benutzt, die mehrere Enzyme des Squalensynthetisierenden Systems enthalten⁸⁸⁾. Gereinigte Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase⁴⁾ wurde freundlicherweise

von Herrn Dr.B. Agranoff zur Verfügung gestellt.

3. Versuche mit 2-Fluormevalonsäure

Aus den Dibenzyläthylen-diammoniumsalzen der beiden Racematenpaare A (Schmp. 148-149°) und B (Schmp. 118-119°) wurden die entsprechenden Kaliumsalze hergestellt: 57,2 mg (0,10 mM) Dibenzyläthylen-diammoniumsalz werden unter geringem Erwärmen (40°) gelöst und über eine 4 mm Säule, in der 2 g Dowex 50 (H⁺-Form) eingeschlämmt sind, filtriert und die Säule mit ca. 15 ml Wasser neutralgewaschen. Das Filtrat wird mit ca. 0,4 ml 5 n KOH neutralisiert, im Vakuum eingeeengt und zu einem Volumen von 2,0 ml gebracht (Endkonz. = 0,1M).

a) Hemmung der Squalensynthese aus 2-¹⁴C-Mevaldinsäure

Je 20 μ M K₂HPO₄, 30 μ M KF, 6 μ M MgCl₂, 0,1 μ M TPNH, 2 μ M ATP, 2 mg lösliche Stärke, 0,1 μ M K-2-¹⁴C-Mevaldinat (1690 IpM) wurden zusammen mit den in Tabelle 7, S.44 angeführten Zusätzen und Wasser zu einem Vol. von 0,4 ml gelöst. Die Reaktion wird durch Zusatz von 0,2 ml zellfreiem Bäckerhefekomogenat (siehe S. 85) in Gang gebracht. Nach 2 Std. Inkubation bei 37° unter N₂ wurde die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml 10 proz. KOH in 70 proz. Methanol abgebrochen. Je 0,2 mg Squalen wurden als Träger zugesetzt und das alkalische Reaktionsgemisch 3 mal mit je 3 ml Petroläther extrahiert. Die vereinigten und mit 2 ml Wasser gewaschenen Petrolätherextrakte wurden eingeeengt, auf Cu-plättchen aufgetragen und im Geiger-Müller-zähler ausgezählt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 7, S. 44 wiedergegeben.

b) Hemmung der Mevalonatkinase

Je 60 μ M KHCO₃, 30 μ M KF, 2 μ M ATP, 6 μ M MgCl₂, 2 μ M K₂-Mg-ÄDTA, 1 mg Serumalbumin, 0,04 μ M D,L K-2-¹⁴C-Mevalonat

(1120 IpM) und wechselnde Zusätze von D,L K-2-Fluormevalonat (A) wie in Tabelle 8, S.44 wurden in Perforationsfinger zusammenpipettiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Mevalonatkinase (10 ug Protein) eingeleitet. Vol. = 0,6 ml. Nach 40 Min. Inkubation bei 37° wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 3 m Trichloressigsäure abgebrochen. Anschließend wurden die sauren Reaktionsgemische 7 Std. mit Äther perforiert. Aliquote der zentrifugierten, wäßrigen Phase wurden auf Cu-plättchen aufgetragen und im Geiger-Müller-zähler ausgezählt.

c) 2-Fluormevalonsäure im optischen Test für die Mevalonatkinase.

Spektrophotometrische Bestimmung der Mevalonatkinase (vgl. ²⁸⁾): Beide Küvetten (d = 1 cm) enthalten 300 uM TRAM/HCl-puffer pH 7,5, 40 uM MgCl₂, 160 uM KCl, 1 uM K₃-Phospho-enolpyruvat, 0,5 uM DPNH, 1 uM ATP, 1 mg Serumalbumin, 25 ug krist. Milchsäure-Dehydrogenase, 10 ug krist. Pyruvatkinase und Enzym in einem Volumen von 1,8 ml. Nach Abklingen der Reaktionen mit den in Spuren vorhandenen Mengen ADP und Brenztraubensäure wird die Reaktion durch Zusatz von 1 uM D,L K-Mevalonat zu einer Küvette eingeleitet. Der durch die zu messende Reaktion bedingte DPNH-Verbrauch wird durch die Extinktionsabnahme bei 366 mμ in der Meßküvette gegen die Blindküvette ermittelt. t = 25°.

Enzymatische Phosphorylierung von D,L 2-Fluormevalonsäure: Unter den Bedingungen des optischen Tests wurde die Reaktion einmal mit der A-Form, ein anderes Mal mit der B-Form des K-2-Fluormevalonats eingeleitet. Nach einem 12 Min. langen Lauf der inaktiven B-Form wurde 1 uM K-Mevalonat zugesetzt, um die Aktivität des Enzyms zu beweisen.

Die Stöchiometrie der enzymatischen Phosphorylierung von 2-Fluormevalonsäure (A) wurde durch Einsatz von 0,2 uM D,L K-2-Fluormevalonat (A) im optischen Test gemessen (Vol. = 2,18 ml, 2 uM DPNH). Die Extinktionsabnahme bei

366 μ bei $\Delta E = 0,159$, entsprechend einem Verbrauch von 0,101 μ M DPNH zum Stillstand (E_{DPNH} , 366 μ = 3,44)

Die Michaeliskonstante der Mevalonatkinase für Mevalonsäure und 2-Fluormevalonsäure wurde ebenfalls mit Hilfe des optischen Tests ermittelt: Um die Temperatur bei den Messungen konstant zu halten, wurden thermostatisierte Küvettenhalter benützt ($t = 25^\circ$). Vor Zugabe des Substrats wurde 5 Min. temperiert. Die Meßergebnisse sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

Substrat	$S \cdot 10^{-3}$ (M/l)	$1/S \cdot 10^3$ (l/M)	E/ Min.	$V \cdot 10^{-4}$ (μ M/Min.)	$1/V \cdot 10^4$ (Min/ μ M)
D, L K- Mevalonat	0,568	1,8	0,0110	0,57	1,74
	0,280	3,6	0,0100	0,52	1,92
	0,056	17,9	0,0047	0,25	4,06
	0,028	35,8	0,0030	0,16	6,40
	0,022	44,6	0,0024	0,13	7,42
	0,017	59,7	0,0018	0,10	10,50
D, L-K- 2-Fluor- mevalonat (A)	0,559	1,8	0,0110	0,57	1,74
	0,112	8,9	0,0044	0,23	4,38
	0,056	17,8	0,0030	0,16	6,41
	0,039	25,6	0,0021	0,11	9,34
	0,028	35,8	0,0015	0,08	12,73

Die Extinktionswerte wurden aus dem Lauf der ersten 10 Minuten graphisch interpoliert. K_M wurde aus der graphischen Auftragung von $1/V$ gegen $1/S$ (siehe Abb.14, S.50) nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁵⁾ ermittelt.

c) Darstellung und Eigenschaften der ^{32}P -5-Phospho-2-Fluormevalonsäure

$\Delta\text{T}^{32}\text{P}$ wurde nach Schneider⁸⁹⁾ durch den Einbau von $^{32}\text{PO}_4$ in AMP mit Hilfe von gewaschenen Rattenlebermitochondrien

drien gewonnen. Das radioaktive Nukleotid wurde an Tierkohle adsorbiert, restliche $^{32}\text{PO}_4$ durch gründliches Waschen mit 0,05 M KH_2PO_4 und Wasser entfernt und anschließend mit 1 proz. konz. NH_3 in 50 proz. Methanol eluiert. Das gefriergetrocknete Präparat wurde in Wasser aufgenommen und der ATP-Gehalt nach der Methode von Holloway⁹⁰⁾ bestimmt.

13,5 μM AT^{32}P (spez. Akt. = $3,8 \cdot 10^6$ IpM/ μM) wurden mit 45 μM D,L K-2-Fluormevalonat (A) und 150 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 20 μM MgCl_2 , 20 μM K_2 -Mg-ÄDTA, 80 μM KF, 5 mg Serumalbumin und Mevalonatkinase (0,16 mg Protein) in einem Vol. von 1,48 ml 3 Std. bei 37° inkubiert.

Nach beendeter Reaktion wurde das Protein durch Zusatz von 0,2 ml 3 M Trichloressigsäure denaturiert und abzentrifugiert. Nach gründlichem Waschen des Niederschlags mit 6 proz. Trichloressigsäure wurden die vereinigten Filtrate über eine 0,8 cm Kationen-Austauschersäule (4 g Dowex 50- H^+) geschickt und mit Wasser gewaschen, bis das Eluat neutral reagierte. Die Trichloressigsäure wurde mit Äther extrahiert und der wäßrige Rückstand gefriergetrocknet, wobei sich HCl und HF verflüchtigten. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit Pyridin neutralisiert und der präparativen Hochspannungs-Papierelektrophorese in Pyridin-Acetat-puffer pH 6,2 unterworfen (90 Min. 40 V/cm, 80-90 mA). Bei der Auszählung eines Leitstreifens im Radio-papierchromatographen zeigte sich, daß neben AD^{32}P (R_{PO_4} 0,49) eine neue, radioaktive Verbindung (R_{PO_4} 1,12) gebildet worden war. Die radioaktive Zone der ^{32}P -Phospho-2-Fluormevalonsäure wurde ausgeschnitten, mit 0,01 M NH_3 eluiert, eingeengt und durch präparative Papierchromatographie auf S & S 2040 b (gew.) in tert. Amylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:3) weiter gereinigt. Die Phosphatanalyse der eluierten und mit KOH neutralisierten Verbindung ergab eine Ausbeute von 10,8 μM (80% d.Th., bzw. auf ATP) K_3 - ^{32}P -5-Phospho-2-Fluormevalonat (spez. Akt. = $1,9 \cdot 10^6$ IpM/ μM). Auf diesem Wege wurden auch unmarkierte 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure und 2- ^{14}C -Phosphomevalonsäure gewonnen.

1 μM K_3 - ^{32}P -5-Phospho-2-Fluor-mevalonat wurde in 1 ml

1 n HCl 7 Min. bei 100° gehalten, anschließend gefriergetrocknet und in Methanol/konz.NH₃/Wasser (6:1:3) chromatographiert. Die Verbindung wanderte unverändert (R_f 0,52, vgl. Tabelle 9, S.51). Der Fleck des anorg. Phosphats (R_f 0,35) war frei von Radioaktivität.

1 µM der Verbindung in 0,5 ml Wasser wurde mit 2 Tropfen 2 proz. KMnO₄-Lösung 2 Std. bei Zimmerptemperatur behandelt und anschließend der Papierelektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 6,2 unterworfen. Die Verbindung wanderte unverändert bei R_{PO₄} 1,12.

4. Versuche mit 5-Phospho-2-Fluormevalonsäure

a) Hemmung der Phosphomevalonatkinase

Je 20 µM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 20 µM KF, 6 µM MgCl₂, 6 µM K₂-Mg-ÄDTA, 2 µM ATP, 7 µM K₃-2-¹⁴C-Phospho-2-Fluormevalonat wie in Tabelle 10, S.54, wurden nach Zusatz von Phosphomevalonatkinase (0,22 mg) und "Nukleinsäurefiltrat"⁸⁸⁾ (0,46 mg Protein) in einem Vol. von 0,6 ml 10 Min. bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,1 ml 3 m Trichloressigsäure beendet. Radioaktives Farnesol und Trichloressigsäure wurden 3 mal mit je 3 ml wassergesättigtem Äther extrahiert und je 0,5 ml des zentrifugierten, wäßrigen Rückstands auf Aluminiumschälchen eingedampft und im Methandurchflußzähler ausgezählt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 10, S.54 wiedergegeben.

b) Die Phosphorylierung von Phospho-2-Fluormevalonsäure: Spektrophotometrie

Die spektrophotometrische Bestimmung der Phosphomevalonkinase²⁸⁾ wurde als Hilfsmittel zur Verfolgung der Phosphorylierung und zur quantitativen Bestimmung von Phospho-2-Fluormevalonsäure verwendet. Die Ansätze und

Bedingungen des optischen Testverfahrens entsprechen genau dem auf S.107 beschriebenen Test für die Mevalonatkinase.

Phosphorylierung der Phospho-2-Fluormevalonsäure:

In einem Versuch wurden 0,44 mg Phosphomevalonatkinase eingesetzt und die durch DPNH-Verbrauch verursachte Extinktionsabnahme bei 366 mμ nach Zusatz von 1 μM K₃-Phosphomevalonat gegen die Blindküvette (ohne Substrat) gemessen. Zum Vergleich wurde die Extinktionsabnahme verfolgt, die durch Zusatz von 1 μM K₃-Phosphomevalonat verursacht wird. Das Ergebnis ist in Abb.15, S.55 graphisch wiedergegeben.

Die Michaeliskonstante der Phosphomevalonatkinase

für Phosphomevalonat und Phospho-2-Fluormevalonat wurde mit Hilfe des optischen Tests bestimmt. Als Enzym wurden beiden Küvetten je 0,44 mg Phosphomevalonatkinase zugesetzt. Die Zusätze von Substraten und die Meßergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Substrat	$S \cdot 10^{-3}$ (M/l)	$1/S \cdot 10^3$ (l/M)	$\Delta E /$ Min.	$V \cdot 10^{-4}$ (μM/Min.)	$1/V$ (Min./μM)
K ₃ -Phosphomevalonat	0,556	1,8	0,0095	0,50	2,00
	0,278	3,6	0,0086	0,45	2,22
	0,111	9,0	0,0071	0,38	2,65
	0,056	18,0	0,0063	0,33	3,05
	0,028	36,0	0,0039	0,21	4,85
K ₂ -Phospho-2-Fluormevalonat	0,556	1,8	0,0087	0,46	2,18
	0,278	3,6	0,0075	0,39	2,58
	0,111	9,0	0,0048	0,25	3,98
	0,056	18,0	0,0031	0,16	6,23

Die Extinktionswerte wurden aus dem linearen Verlauf der ersten 10 Min. graphisch interpoliert. K_M wurde aus der Auftragung von 1/V gegen 1/S (siehe Abb.16, S.56) durch graphische Extrapolation nach der Methode von Lineweaver und Burk⁵⁵⁾ ermittelt.

c) Darstellung und Eigenschaften der ^{32}P -5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure

^{32}P -Phospho-2-Fluormevalonsäure wurde mit ATP und Phosphomevalonatkinase zur ^{32}P -5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure phosphoryliert. Um die Reaktion durch Verschiebung des Gleichgewichts ganz auf die Seite der Synthese zu verschieben, wurde das gebildete ADP durch Reaktion mit Phospho-enolpyruvat und Pyruvatkinase wieder zu ATP aufphosphoryliert:

0,45 μM K_3 - ^{32}P -Phospho-2-Fluormevalonat (9380 IpM) wurden zusammen mit 30 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 6 μM MgCl_2 , 6 μM K_2 -Mg-ÄDTA, 5 μM ATP, 4 μM K_3 -Phospho-enolpyruvat, 2 mg Serumalbumin, 40 μg krist. Pyruvatkinase und Phosphomevalonatkinase (0,25 mg Protein) in einem Vol. von 0,76 ml 2 Std. bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1 Min. Erhitzen auf 100° beendet, der Niederschlag des ausgefallenen Proteins abzentrifugiert und mehrmals mit Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und der Hochspannungs-Papierelektrophorese in Pyridin-Acetat-puffer pH 6,2 unterworfen. Die radioaktive Zone der ^{32}P -Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure ($R_{\text{PO}_4} = 1,12$) wurde ausgeschnitten, eluiert, gefriergetrocknet, in wenig Wasser aufgenommen und auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) aufgetragen und in tert. Amylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:2) 24 Std. absteigend chromatographiert. Die ausgeschnittenen Zone ($R_{\text{PO}_4} = 0,52$) der radioaktiven Verbindung wurde eluiert und gefriergetrocknet, der Rückstand in 1 ml Wasser gelöst mit KOH neutralisiert und in einer Probe die Radioaktivität bestimmt (8460 IpM = 90% d.Th.).

Auf analogem Wege wurden auch 2- ^{14}C -Pyrophosphomevalonat und nichtmarkierte Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure und Pyrophosphomevalonsäure gewonnen und gereinigt (100 μM -Ansätze).

1 μM K_4 - ^{32}P -Pyrophospho-2-Fluormevalonat ($1,7 \cdot 10^3$ μpM) wurde in 1 ml 1 n HCl aufgenommen und 7 Min. auf 100° erhitzt. Dann wurde die Lösung rasch eingefroren und gefriergetrocknet und der Rückstand in tert. Amylalkohol/

Eisessig/Wasser (4:1:2) chromatographiert. Die Auswertung des Papierstreifens im Radiopapierchromatographen ergab, daß sich die ^{32}P -Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure ($R_{\text{PO}} = 0,52$) quantitativ in die säurestabile ^{32}P -Phospho-2-Fluormevalonsäure umgewandelt hatte.

5. Versuche mit 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure

a) Hemmung der Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase

Die Ansätze enthielten je 20 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 6 μM MgCl_2 , 6 μM $\text{K}_2\text{-Mg-ÄDTA}$, 1 μM ATP, 2 μM $\text{K}_3\text{-Phospho-enolpyruvat}$, 10 μg krist. Pyruvatkinase, Phosphomevalonatkinase (0,16 mg Protein), Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase (0,4 mg Protein), Isomerase ("Nukleinsäurefiltrat"⁸⁸), (2 mg Protein). Vol = 0,6 ml. Die Reaktion wurde durch Zusatz von je 3,4 μM $\text{K}_4\text{-2-}^{14}\text{C}$ -Pyrophosphomevalonat (1140 IpM) und wechselnde Mengen von $\text{K}_4\text{-Pyrophospho-2-Fluormevalonat}$ wie in Tabelle 12, S.60 eingeleitet und nach 4 Min. bei 37° durch Zusatz von 0,1 ml 3 m Trichloressigsäure abgebrochen. Die Aufarbeitung und Zählung erfolgte nach dem auf S.110 beschriebenen Verfahren.

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 12, S.60 wiedergegeben.

b) Unwirksamkeit von 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure als Substrat für die Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase: Spektrophotometrie

Das bei der ATP-abhängigen Dekarboxylierung der Pyrophosphomevalonsäure freiwerdende ADP wird mit demselben Hilffsystem verfolgt, das für die spektrophotometrische Bestimmung der Mevalonatkinase auf S.107 beschrieben ist.

In einem Versuch, der die Möglichkeit einer Dekarboxylierung der Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure qualitativ untersuchen sollte, wurden 0,5 mg Pyrophosphomevalonat-

Dekarboxylase und - statt 1 μM - 5 μM ATP eingesetzt.

Abb.17, S.60 gibt die durch den DPNH-Verbrauch bedingte Extinktionsabnahme bei 366 μm in der Meßküvette gegenüber der Vergleichsküvette wieder. Nach dem Start mit 0,047 μM K_4 -Pyrophospho-2-Fluormevalonat erfolgte anfangs nur eine kleine Abnahme, nach der sich für weitere 25 Min. nichts mehr änderte. Der Zusatz von 0,019 μM K_4 -Pyrophosphomevalonat sollte die Aktivität des Enzyms nachprüfen. Zum Vergleich wurde die Abnahme der Extinktion von 0,019 μM K_4 -Pyrophosphomevalonat allein gemessen.

c) Inkubation von 5-Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure mit Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase

10 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 2,5 μM MgCl_2 , 4 μM K_2 -Mg-ÄDTA, 1 μM ATP, 1 μM K_3 -Phospho-enolpyruvat, 1 μM Jodacetamid, 0,5 mg Serumalbumin und 0,047 μM K_4 - ^{32}P -Pyrophospho-2-Fluormevalonat (4340 IpM) wurden zusammen mit 10 μg krist. Pyruvatkinase, Phosphomevalonatkinase (0,16 mg Protein) und 0,5 mg Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase ("Nukleinsäurefiltrat"⁸⁸) in einem Vol. von 0,2 ml 80 Min. bei 37° inkubiert. Zur Kontrolle wurden in 2 parallelen Ansätzen 0,074 μM K_4 -2- ^{14}C -Pyrophosphomevalonat (4150 IpM) mit und ohne 0,047 μM K_4 - P^{32}P -2-Fluorpyrophosphomevalonat unter denselben Bedingungen inkubiert.

Nach Zusatz von 0,015 ml 3 m Trichloressigsäure und 3 maliger Extraktion mit je 2 ml Äther wurden die Reaktionsgemische zentrifugiert und die Überstände jeweils 3 mal mit je 2 ml Äther extrahiert, um überschüssige Trichloressigsäure zu entfernen. Jeder Ansatz wurde mit je 5 μM K_3 -ÄDTA pH 6,8 versetzt, um störendes Magnesium zu binden und auf 7 cm Startlinie auf Schleicher & Schüll-Papier 2040 b (mit HCl gewaschen) aufgetragen. Nach 24-stündiger, absteigender Chromatographie in tert. Amylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:2) wurden 3,5 cm breite Streifen ausgeschnitten und im Radiopapierchromatographen ausgewertet. Während die Pyrophospho-2-Fluormevalonsäure unverändert bei R_{PO_4} 0,52 wanderte, hatte sich aus 2- ^{14}C

Pyrophosphomevalonsäure quantitativ 1-¹⁴C-Isopentenylpyrophosphat (R_{PO_4} 1,16) gebildet, auch in Gegenwart von Pyrophospho-2-Fluormevalonat.

IV. Versuche mit 3'-Fluormevalonsäure

1. Die Umwandlung von 3'-Fluormevalonsäure in den Phosphor- und Pyrophosphorsäure-ester: spektrophotometrische Bestimmung der Stöchiometrie

Vorversuche mit dem Dibenzyläthylen-diammoniumsalz der Mevalonsäure hatten ergeben, daß die organische Base bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Mevalonatkinase nicht stört. Deshalb wurde das Basensalz der 3'-Fluormevalonsäure als solches in den folgenden Versuchen eingesetzt. 57,2 mg (0,1 μ M) Dibenzyläthylen-diammonium-3'-Fluormevalonat (Schmp. 105-106°) wurden in 2 ml Wasser gelöst (Konz. = 0,1 m).

Die Stöchiometrie der Phosphorylierung wurde mit dem auf S. 107 beschriebenen Test für die Mevalonatkinase ermittelt. Neben den übrigen Komponenten wurden 0,44 mg Mevalonatkinase eingesetzt, Vol. = 1,89 ml. Abb. 18, S. 66 zeigt den durch den Verbrauch an DPNH bedingten Abfall der Extinktion bei 366 m μ , der durch Zusatz von 0,032 μ M D,L-3'-Fluormevalonat verursacht wird:

$$\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0,030 \quad \text{entspr. } 0,015 \text{ } \mu\text{M DPNH}$$

Die erneute Extinktionsabnahme bei Zusatz von 0,29 mg Phosphomevalonatkinase beweist, daß die im ersten Schritt gebildete Phospho-3'-Fluormevalonsäure auch in den Pyrophosphorsäure-ester umgewandelt werden kann.

Die Stöchiometrie der Phosphorylierung von 5-Phospho-3'-Fluormevalonsäure wurde durch Kombination der Enzyme Mevalonatkinase, Phosphomevalonatkinase und Pyro-

phosphomevalonat-Dekarboxylase im optischen Test ermittelt. Da jedes der drei Enzyme getrennt mit Hilfe derselben spektrophotometrischen Methode und durch Einsatz des für das jeweilige Enzym spezifischen Substrats bestimmt werden kann, kann man durch Kombination der drei Enzyme ermitteln, wieviele Schritte in der enzymatischen Reaktionsfolge von der 3'-Fluormevalonsäure durchlaufen werden können.

Zu den übrigen auf S.107beschriebenen Zusätzen wurden in die Meß- und Vergleichsküvette je 0,44 mg Mevalonatkinase, 0,29 mg Phosphomevalonatkinase und 0,31 mg Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase einpipettiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,032 μM D,L-3'-Fluormevalonat in die Meßküvette, Vol. = 1,89 ml. In Abb. 18 S. 66 ist die Extinktionsabnahme bei 366 μm in der Meßküvette gegen die Vergleichsküvette wiedergegeben. Die Reaktion kam bei $\Delta E_{366 \mu\text{m}} = 0,061$, entsprechend einem Verbrauch von 0,033 μM ATP zum Stillstand. Um die Aktivität der Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase nachzuprüfen, wurde der Meßküvette nach Abklingen der Reaktion 0,19 μM K_4 -Pyrophosphomevalonat zugesetzt, worauf die Extinktion erneut rasch abfiel.

2. Enzymatische Synthese von ^{32}P -markierter 5-Phospho- und 5-Pyrophospho-3'-Fluormevalon- säure

^{32}P -Phospho-3'-Fluormevalonsäure und ^{32}P -Pyrophospho-3'-Fluormevalonsäure wurden in Ansätzen von 20 μM aus dem Dibenzyläthylen-diammoniumsalz der D,L-3'-Fluormevalonsäure nach den auf S.108 und 112 beschriebenen Methoden dargestellt und gereinigt. Die R_f - und $R_{\text{P}0_4}$ -Werte sind in Tabelle 13, S. 68 wiedergegeben.

3. Versuch zur Synthese von ^{32}P -4'-Fluor-isopentenyl-pyrophosphat

In 3 verschiedenen Ansätzen wurden je 10 μM Tris/HCl-puffer pH 8,0, 2,5 μM MgCl_2 , 4 μM $\text{K}_2\text{-Mg-ÄDTA}$, 1 μM ATP, 1 μM $\text{K}_3\text{-Phospho-enolpyruvat}$, 1 μM Jodacetamid, 0,5 mg Serumalbumin, 20 μg krist. Pyruvatkinase, 0,2 mg Phosphomevalonatkinase, 1 mg Pyrophosphomevalonat-Dekarboxylase ("Hitzesaft"⁸⁸) in einem Endvolumen von 0,3 ml einmal 0,05 μM ^{32}P -Phospho-3'-Fluormevalonat ($2,5 \cdot 10^5$ IpM), in einem zweiten Ansatz 0,57 μM 2- ^{14}C -Phosphomevalonat ($6,9 \cdot 10^3$ IpM) und im dritten Ansatz die beiden radioaktiven Substrate zusammen 2 Std. bei 37° inkubiert. Die Aufarbeitung und Papierchromatographie erfolgte wie auf S.61 beschrieben. Die Chromatogramme wurden in Streifen geschnitten und getrennt im Radio-Papierchromatographen ausgewertet. Während die radioaktive Phospho-3'-Fluormevalonsäure (R_f 1,03) größtenteils in den Pyrophosphorsäureester (R_{PO} 0,61) umgewandelt war, hatte sich aus 2- ^{14}C -Phosphomevalonsäure fast quantitativ radioaktives Isopentenyl-pyrophosphat (R_{PO} 1,22) gebildet, auch in Gegenwart der fluorierten Verbindung.

D. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat aus Farnesyl-pyrophosphat und Isopentenyl-pyrophosphat studiert:

Das dazu benötigte Farnesyl-pyrophosphat wurde aus Farnesol über Hexabromfarnesol und Farnesyl-phosphorsäureamid synthetisiert und in Form des kristallisierten Triammoniumsalzes in einer Gesamtausbeute von 7% gewonnen.

Aus Bäckerhefe wurde eine Proteinfraction 5 fach angereichert, die die Alkylierung von 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat mit Farnesyl-pyrophosphat katalysiert. Wie sich bei systematischen Untersuchungen ergab, hat die enzymatische Reaktion ein scharfes pH-Optimum bei pH 6,0; sie benötigt Magnesiumionen als Aktivator und ist streng spezifisch für den Pyrophosphorsäure-ester des Farnesols (Farnesyl-phosphat wird nicht verwertet). Mit dem gereinigten Enzym wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Farnesyl-pyrophosphat ausgearbeitet: es zeigte sich, daß die synthetische Verbindung nur zu 65% biologisch aktiv ist.

Mehrere Indizien sprechen dafür, daß das Enzym identisch ist mit der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase: Die Parallelität des Anreicherungsgangs, dasselbe pH-Optimum und dieselbe Michaeliskonstante für Isopentenyl-pyrophosphat bei pH 8,0.

Das Reaktionsprodukt wurde mit Phosphatase hydrolysiert und das radioaktive, organische Bruchstück durch Überführung in den kristallinen 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-4-ester als Geranylgeraniol identifiziert. Das bei der Säurespaltung des ³²P-markierten Reaktionsprodukts erhaltene radioaktive, wasserlösliche Bruchstück wurde papierchromatographisch als anorganisches Pyrophosphat identifiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Hemmwirkung von 2- und 3'-Fluormevalonsäure auf die Biosynthese des Squalens aus Mevalonsäure untersucht: Beide Verbindungen werden mit ATP durch die Mevalonatkinase zu den 5-Phospho- und durch die Phosphomevalonatkinase zu den entsprechenden 5-Pyrophosphomevalonsäure-Derivaten phosphoryliert. In der enzymatischen Dekarboxylierung der Pyrophosphomevalonsäure zum Isopentenyl-pyrophosphat wurde bei beiden fluorierten Derivaten nur eine kompetitive Hemmung, aber keine weitere Umwandlung beobachtet.

Die mit ^{32}P markierten Verbindungen, die durch mikropräparative Inkubation mit AT^{32}P gewonnen wurden, verhielten sich bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese und bei der Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln wie 5-Phospho- und 5-Pyrophosphomevalonsäure, mit geringen, durch den Fluorsubstituenten bedingten, Unterschieden.

Von den 4 Stereoisomeren der 2-Fluormevalonsäure wird wegen der Stereospezifität der Mevalonatkinase nur eines in den Pyrophosphorsäure-ester umgewandelt, dieses allerdings fast ebenso rasch wie das natürliche Substrat, die Mevalonsäure. D,L-3'-Fluormevalonsäure ist dagegen 50% aktiv, in vollständiger Analogie zur synthetischen D,L-Mevalonsäure.

Im Falle der 2-Fluormevalonsäure wurde die Hemmwirkung der Verbindung auf die Squalensynthese genauer untersucht: Bei der Phosphorylierung der Mevalonsäure und der Phosphomevalonsäure und bei der Umwandlung der Pyrophosphomevalonsäure in Isopentenyl-pyrophosphat wirken die entsprechenden fluorierten Derivate als kompetitive Hemmstoffe. Diese dreifache Hemmwirkung führt in vitro zu einer Gesamthemmung der Squalensynthese von 86%.

Literaturverzeichnis

1. Lynen F., Henning U. Angew.Chem. 72 (1960) S.820
2. Chaykin S., Law J., Phillips A.H., Tchen T.T.,
Bloch K. Proc.Nat. Acad.Sci.USA 44 998 (1958)
3. Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I.
Angew.Chem. 70 738 (1958)
4. Agranoff B.W., Eggerer H., Henning U., Lynen F.
J.biol.Chemistry 235 326 (1960)
5. Lynen F., Agranoff B.W., Eggerer H., Henning U.,
Möslein, E.M. Angew.Chem. 71 657 (1959)
6. Langdon R.G., Bloch K., J.biol. Chemistry 200 129 (1953)
7. Woodward R.B., Bloch K. J.Amer.chem.Soc. 75 2023 (1953)
8. Ruzicka L. Experientia (Basel) 9 357 (1953)
9. Stanley R.G. Nature (London) 182 738 (1958)
10. Arigoni D. in G.E.W. Wolstenholme u.M.O'Connor,
Ciba Foundation Symposium on the "Bio-
synthesis of Terpenes and Sterols",
J.and A.Churchill, Ltd., London (1959) S.231
11. Birch A.J. ibid. S.245
12. Grob E.C. Chimia 11 338 (1957)
13. Braithwaite G.D., Goodwin T.W. Biochem.J. 67 13^P (1957)
14. Stoffel W., Martius C. Angew.Chem. 72 627 (1960)
15. Martius C., Esser O.H. Biochem.Z. 331 1 (1959)
16. Gloor U., Wiss O. Experientia (Basel) 14 410 (1958)
17. Park R., Bonner J. J.biol.Chemistry 233 340 (1958)
18. Demole E., Lederer E. Bull.Soc.chim.France 1128 (1958)
19. Rowland R.L., Latimer P.H., Giles J.A.
J.Amer.chem.Soc. 78 4680 (1956)
20. Erickson R.E., Shunk C.H., Trenner N.R., Arison B.H.,
Folkers K. ibid. 81 4999 (1959)
21. Kofler M., Langemann A., Rüegg R., Gloor U.,
Schwieter U., Würsch J., Wiss O., Isler O.
Helv.chim.Acta 42 2252 (1959)
22. Pennock J.F., Hemming F.Q., Morton R.A.
Nature (London) 186 472 (1960)
23. Henning U. unveröffentlichte Versuche

24. Popják G. Tetrahedron letters 19 19 (1959)
25. Karrer P., Kramer H. Helv.chim.Acta 27 1301 (1944)
26. Lynen F., Henning U., Bublitz C., Sörbo B.,
Kröplin-Rueff L. Biochem.Z. 330 269 (1958)
27. Bucher N.L.R., Overath O., Lynen F.
Biochim.Biophys.Acta 40 491 (1960)
28. Henning U., Möslein E.M., Lynen F.
Arch.Biochem.Biophys. 83 259 (1959)
29. Bloch K., Chaykin S., Phillips A.H., de Waard A.
J.biol.Chemistry 234 1595 (1959)
30. de Waard A., Phillips A.H., Bloch K.
J.Amer.chem.Soc. 81 1913 (1959)
31. Wright L.D., Cresson E.L., Skeggs H.R., Mac Rae G.D.E.,
Hoffman C.H., Wolf D.E., Folkers K.
ibid. 78 5273 (1956)
32. Bergmann E.D., Cohen S. Tetrahedron letters 8 20 (1960)
33. Stewart J.M., Woolley D.W. Fed.Proc. 18 1315 (1959)
34. Folkers K., Shunk C.H., Linn B.O., Robinson F.M.,
Wittreich P.E., Huff J.W., Gilfillan J.L.,
Skeggs H.R. in G.E.W. Wolstenholme and
M.O'Connor, Ciba Foundation Symposium
on the "Biosynthesis of Terpenes and Sterols"
J.and A.Churchill, Ltd., London, 1959 S.20
35. Isler O. ibid. S.135
36. Daenicker H.V., Druey J. Helv.chim.Acta 43 983 (1960)
37. Morrison J.F., Peters R.A. Biochem.J. 58 473 (1954)
38. Fried J., Sabo E.F. J.Amer.chem.Soc. 75 2273 (1953)
39. Fried J., Sabo E.F. ibid. 76 1455 (1954)
40. Fried J., Herz J.E., Sabo E.F., Borman A., Singer F.M.,
Numerof P. ibid. 77 1068 (1955)
41. Hirschmann R.F., Miller R., Beyler R.E., Sarett L.H.,
Tischler M. ibid. 77 3166 (1955)
42. Hogg J.A., Lincoln F.H., Jackson R.W., Schneider W.R.
ibid. 77 6401 (1955)
43. Phillips A.G., Langdon R.G. Arch.Biochem.Biophys.
58 247 (1955)
44. Eggerer H., Lynen F. Liebigs Ann.Chem. 630 58 (1960)

45. Eggerer H. Chem.Ber. (i.Druck)
46. Cramer F., Böhm W. Angew.Chem. 71 775 (1959)
47. Naves Y.R., Bull.Soc.chim.France 505 (1951)
48. Isler O., Ruegg R., Chopard-dit-Jean L.H., Winterstein A., Wiss O., Helv.chim.Acta 41 786 (1958)
49. Nicolaides N., Laves F. J.Amer.chem.Soc. 76 2596 (1954)
50. Langdon R.G., Bloch K. J.biol.Chemistry 200 135 (1953)
51. v.Soden H., Treff W. Chem.Ber. 37 1094 (1904)
52. Mondon A., Teege G. ibid. 91 1014 (1958)
53. Naves Y.R., Ardizio N. Helv.chim.Acta 31 1243 (1948)
54. Gloor U., Isler O., Morton R.A., Ruegg R., Wiss O. ibid. 41 2357 (1958)
55. Lineweaver H., Burk D., J.Amer.chem.Soc. 56 658 (1934)
56. Warburg O., Christian W. Biochem.Z. 266 377 (1933)
57. Kaufmann H.P., Nitsch W.H., Fette u.Seifen 56 154 (1954)
58. Bailey K., Webb E.C. Biochem.J. 42 60 (1948)
59. Vernon C.H. in "Phosphoric acids and related compounds", Special publications Nr.8, London, The Chemical Society (1957) S.24 ff.
60. Ruzicka L., Capato E. Helv. chim.Acta 8 259 (1925)
61. Witting L.A., Porter J.W. J.biol.Chem. 234 2841 (1959)
62. Hecker E. Chem.Ber. 88 1666 (1955)
63. Ruzicka L., Firmenich G. Helv.chim.Acta 22 392 (1939)
64. Ebel J.P., Volmar Y.C.R. hebdomadaire Seances Acad.Sci. 233 415 (1951)
65. Hoffmann C.H., Wagner A.F., Wilson A.N., Walton E., Shunk C.H., Wolf D.E., Holly F.W., Folkers K. J.Amer.chem.Soc. 79 2316 (1957)
66. Eberle M., Arigoni D. Helv.chim.Acta 43 1508 (1960)
67. Cahn R.S., Ingold C.K., Prelog V. Experientia 12 81 (1956)
68. Lynen F., Grassl M. Z.physiol.Chem. 313 291 (1958)
69. Privatmitteilung Dr.Schmidt (Fa.K.Thomae)
70. Eggerer H., Lynen F., Rauenbusch E., Kessel J. Liebigs Ann.Chem. 608 71 (1957)
71. Lynen F. in G.E.W. Wolstenholme and M.O'Connor Ciba Foundation Symposium on the "Biosynthesis of Terpenes and Sterols", J.and A.Churchill, Ltd., London, 1959, S.95

72. Popják G. *ibid.* S.148
73. Tchen T.T. *J.Amer.Chem.Soc.* 79 6344 (1957)
74. Slein M.W., Cori G.T., Cori C.F. *J.biol.Chemistry*
186 763 (1950)
75. Dippy J.F.J., *Chem.Reviews* 25 151 (1939)
76. Kirschner K. Diplomarbeit, München (1958)
77. Singer, F.M., Januszka J.P., Borman A.
Proc.Soc.Exp. Med. 102 370 (1959)
78. King E.J. *Biochem.J.* 26 292 (1932)
79. Hanes C.S., Isherwood F.H., *Nature (London)* 164
1107 (1947)
80. v.Braun J. *Chem.Ber.* 41 2145 (1908)
81. Utter F.M., Keech D.B., Nossal P.M.
Biochem.J. 68 431 (1958)
82. Mergenthaler M., Schloßmann K., Kurz W.
Biochem. Z. 329 332 (1957)
83. Schmidt G. in "Methods in Enzymology", S.P. Colowick
and N.O.Kaplan, Academic Press, New York 2
523 (1955)
84. Beisenherz, G., Boltze H.J., Bücher Th., Czok R.,
Garbade K.H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G.
Z. Naturforsch. 8b 553 (1953)
85. Willstätter R., Kraut H. *Chem.Ber.* 56 1117 (1923)
86. Bandursky R., Axelrod P. *J.biol.Chemistry* 193
405 (1951)
87. Wieland Th., Pfeleiderer G. *Angew.Chem.* 67 257 (1955)
88. Henning U., unveröffentlichte Versuche
89. Schneider W.C. *J.biol.Chem.* 176 259 (1948)
90. Holloway B.W. *Arch.Biochem.Biophys.* 52 33 (1954)

L e b e n s l a u f

Am 23. Juni 1933 wurde ich in Tandjong Morawa, Sumatra, geboren. Mein Vater ist Max Josef Kirschner, Dipl. Landwirt, meine Mutter, Marie-Luise Kirschner, geb. Roesger.

Bis zum Jahre 1940 wuchs ich auf der Tabakplantage meines Vaters auf. Infolge des 2. Weltkrieges wurden wir als deutsche Staatsbürger in verschiedenen Holländischen Lagern interniert, bis uns die Japaner 1942 befreiten. In Padang, an der Westküste Sumatras, wurde ich bis 1945 in einer Missionsschule erzogen. Im folgenden Jahr fand ich an der Bishop Cotton School, Simla, Indien, einem Englischen Internat, Aufnahme, wo ich im Dezember 1950 mit dem "Cambridge School Certificate" abschloß. 1951 kam ich mit meiner Familie nach München und legte im darauf folgenden Jahr die Reifeprüfung an der Gisela Oberrealschule ab.

Seit dem Wintersemester 1952 studiere ich an der Ludwig Maximilian Universität München, legte im Februar 1955 die Diplom-Vorprüfung und im Mai 1957 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab. Von September 1957 bis August 1958 führte ich eine Diplomarbeit über das Thema "Darstellung und Eigenschaften der D,L-5-Phosphomevalonsäure" und anschließend die vorliegende Doktorarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen aus.

